

Untersuchungen zur Rolle der Ekto-5'-Nukleotidase (CD73) in der Entwicklung der renalen Fibrose



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Isabel Anna Carota

aus München
im Jahr 2013

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

05.02.2013

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Hayo Castrop

Unterschrift:

Wer sich Steine zurechtlegen kann, über die er stolpert,
hat Erfolg in den Naturwissenschaften.

Erwin Chargaff

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	4
1. Einleitung	7
1.1 Aufgaben und Regulation der Niere.....	8
1.2 Enzymatische Funktion der Ekto-5'-Nukleotidase (CD73)	9
1.2.1 Renale Bedeutung von Adenosin und Adenosinrezeptoren	11
1.2.2 Renale Funktion von CD73-defizienten Mäusen	14
1.2.3 Untersuchungen zur pathophysiologischen Rolle von CD73.....	15
1.2.4 Pharmakologische Bedeutung von CD73.....	16
1.3 Nicht-enzymatische Funktionen von CD73	17
1.4 Die Entwicklung der renalen Fibrose	19
1.4.1 Molekulare Mechanismen der Fibrogenese.....	20
1.4.2 Beteiligung von zirkulierenden hämatopoetischen Zellen an der Fibrogenese	21
1.4.3 Beteiligung ortsständiger Zellen des Nierengewebes an der Fibrogenese	22
1.5 Irreversible Umwandlung und Progression in der renalen Fibrose	25
2. Zielsetzung.....	27
3. Material und Methoden.....	28
3.1 Material	28
3.1.1 Materialien und Geräte	28
3.1.2 Verbrauchsmaterial	30
3.1.3 Chemikalien und Reagenzien.....	31
3.1.4 Zellkulturmedien und Zusätze	33
3.1.5 Puffer.....	33
3.1.6 Antikörper	35

3.1.7 Primersequenzen	35
3.1.8 Software	36
3.2 Versuchstiere	37
3.3 Methoden	37
3.3.1 Unilaterale Ureterobstruktion	37
3.3.2 Quantitative Bestimmung der mRNA Expression fibrotischer Markergene	38
3.3.3 Quantitative Bestimmung des Proteingehalts ECM Moleküle mittels Western Blot Analyse	39
3.3.4 Immunhistochemie	40
3.3.5 Bestimmung des Gesamtcollagengehalts mittels Sirius Red / Fast Green Färbung	40
3.3.6 Messungen der glomerulären Filtrationsrate (GFR) fibrotischer Nieren	41
3.3.7 Präparation von Nierenzellen für die FACS-Analyse	42
3.3.8 Antikörperfärbung von Oberflächenproteinen spezifischer fibrotischer Zellen	43
3.3.9 Färbung von Fibrozyten für die FACS-Analyse	43
3.3.10 Durchflusszytometrie	44
3.3.11 Magnetische Zellseparation	44
3.3.12 Differenzierung von Monozyten zu Fibrozyten durch Co- Inkubation mit CD4+ T-Lymphozyten	45
3.3.13 Nachweis von Collagen I mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)	46
3.3.14 Transplantation von hämatopoetischen Knochenmarks- stammzellen nach letaler Bestrahlung	46
3.3.15 Statistik	48

4. Ergebnisse	49
4.1 CD73-Expression in der fibrotischen Niere	49
4.2 mRNA Expressionen fibrotischer Markergene	50
4.3 Proteinexpressionen fibrotischer Marker im Nierengewebe.....	58
4.4 Bestimmung der GFR nach reversibler UUO.....	62
4.5 FACS-Analyse fibrotischer Zellen	64
4.6 Differenzierung von Monozyten zu Fibrozyten in Abhängigkeit von der CD73-Expression.....	66
4.7 Entwicklung der renalen Fibrose in Abhängigkeit einer CD73-Expression auf hämatopoetischen Stammzellen	69
5. Diskussion.....	77
6. Ausblick.....	88
7. Zusammenfassung.....	89
8. Abstract	91
9. Literaturverzeichnis	92
10. Anhang.....	102
Abbildungsverzeichnis	102
Abkürzungsverzeichnis	106
Lebenslauf	109
Danke	111

1. Einleitung

Chronische Erkrankungen der Niere stellen ein großes Gesundheitsproblem mit einer Vielzahl an Betroffenen dar und führen jährlich zum Tod von ca. 850.000 Menschen (Schieppati and Remuzzi 2005). Für Patienten, die an einer chronischen Nierenerkrankung leiden, besteht sowohl ein erhöhtes Risiko einer kardiovaskulären Erkrankung als auch die Gefahr eines Nierenversagens. Die Anzahl an Menschen, die dialysepflichtig sind oder eine Nierentransplantation benötigen, steigt dabei stetig. Waren es 1991 in den USA noch 209.000 Menschen, die bzgl. eines Nierenversagens behandelt wurden, so stieg die Zahl 2004 bereits auf 472.000 und 2008 auf 548.000 Patienten (Collins, Foley et al. 2011; Collins, Foley et al. 2012). Daher ist die Früherkennung einer beginnenden Störung der Nierenfunktion essentiell, um einem weiteren Fortschreiten der Krankheit vorzubeugen. Eine Nierenfunktionsstörung ist dabei durch eine glomeruläre Filtrationsrate (GFR) mit Werten unter 60ml/min (entspricht ~50% der physiologischen GFR des Menschen) oder durch eine Schädigung der Niere, die länger als drei Monate andauert, definiert (Foundation 2002). Zur Vorsorge wird bei Risikopatienten die Urin-Albuminausscheidung und die GFR durch Messung der Serum-Kreatinin-Konzentration, bestimmt (Sarnak MJ 2003). Nachdem eine chronische Erkrankung der Niere festgestellt wurde, muss zunächst die Ursache dafür geklärt werden, bevor mit einer gezielten Behandlung begonnen werden kann. Zu den Hauptursachen zählen heute vor allem Hypertonie und Diabetes (Haroun, Jaar et al. 2003). Patienten, die eine erniedrigte GFR aufweisen, besitzen ein erhöhtes Risiko zur Verschlechterung der Symptomatik. Im weiteren Verlauf der Krankheit kann dies zu einer eingeschränkten Nierenfunktion, bis hin zum Nierenversagen und letztlich zum Tod des Patienten führen (Stevens L.A. 2006). Die große Anzahl an Patienten, die bereits an einer chronischen Nierenerkrankung leiden oder ein erhöhtes Risiko dafür tragen, erfordert eine gezielte Forschung, um die vorhandenen Therapie-und Vorsorgemöglichkeiten zu verbessern. Diesbezüglich werden in der Grundlagenforschung stets neue mögliche Angriffspunkte für eine pharmakologische Behandlung bestimmter Nierenerkrankungen gesucht. Potentielle Pharmazeutika werden, bevor sie klinisch getestet werden, zunächst mittels geeigneter *in vivo* Modelle auf ihre Wirkung getestet.

1.1 Aufgaben und Regulation der Niere

Die Niere spielt eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Salz- und Wasserhomöostase. Neben der Steuerung der renalen Exkretion von Wasser und Elektrolyten ist sie außerdem in der Lage Hormone, wie das blutdruckregulierende Renin, zu produzieren. Des Weiteren wird in der Niere das Hormon Erythropoetin synthetisiert, welches für die hämatopoetische Erythrozytenbildung verantwortlich ist. Auch Calcitriol, das am Knochenstoffwechsel und der Calciumhomöostase beteiligt ist, wird in der Niere generiert.

Das Filtrationssystem der Niere besteht aus einzelnen funktionellen Einheiten, welche als Nephron bezeichnet werden. Den ersten Teil des Nephrons bildet das *Corpusculum renale*, das aus dem Glomerulus und der Bowman Kapsel besteht. Beide Strukturen bilden zusammen die Blut-Harn-Schranke. An den glomerulären Kapillaren findet die primäre Blutfiltration statt, wobei Zellen, Proteine und große Moleküle abgetrennt werden. In den folgenden Tubulussegmenten werden Salze und Wasser aus dem Primärharn reabsorbiert, wobei der sog. Sekundärharn entsteht. Über die Sammelrohre der einzelnen Nephronen wird das Filtrat in den Ureter und weiter zur Exkretion in die Harnblase geleitet (Klinke R. 2005).

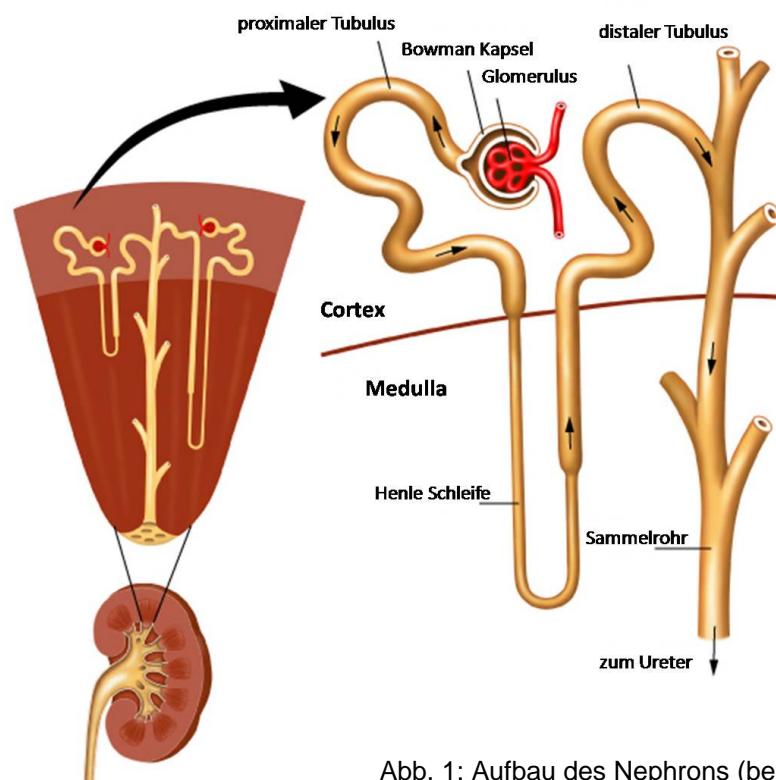


Abb. 1: Aufbau des Nephrons (beltina.org)

Die Funktionen der Niere stehen unter der Kontrolle der systemischen neurohumoralen Regulation. Zusätzlich wird die Nierenfunktion auch durch primäre, intrarenale, lokale Mechanismen gesteuert. Ein bedeutender Kandidat, der zu dieser lokalen Regulation beiträgt, ist das Adenosin. Adenosin hat in der Niere vor allem Einfluss auf das vaskuläre System, das tubuloglomeruläre Feedback (TGF), die Reninsekretion und auf Transportprozesse im Tubulus und im Sammelrohr (Vallon, Muhlbauer et al. 2006). Adenosin wird in der Niere sowohl intra-als auch extrazellulär produziert (Sparks and Bardenheuer 1986). Dabei stammt Adenosin meist aus dem Abbau von Adenosin-Triphosphat (ATP), welcher durch Dephosphorylierungsreaktionen katalysiert wird. Eines der, an der Adenosinentstehung maßgeblich beteiligten, Enzyme ist die Ekto-5'-Nukleotidase CD73. Mehrere Studien postulieren eine wesentliche Beteiligung von CD73 an der Regulation der extrazellulären Adenosinkonzentration und somit einer Beteiligung an der Steuerung der Nierenfunktion (Le Hir and Kaissling 1993; Castrop, Huang et al. 2004).

1.2 Enzymatische Funktion der Ekto-5'-Nukleotidase (CD73)

Zirkulierendes oder lokal ausgeschüttetes ATP wird durch verschiedene Dephosphorylierungsschritte zu Adenosin abgebaut. Bezüglich der extrazellulären Adenosinentstehung, spielen zwei bestimmte Ektoenzyme, die Ektoapyrase CD39 und die Ekto-5'-Nukleotidase CD73, eine zentrale Rolle. Bei CD73 handelt es sich um ein 70 kDa großes Glykosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-verankertes, membrangebundenes Glykoprotein dessen Hauptaufgabe darin besteht, extrazelluläres Adenosin-5'-Monophosphat (AMP) in bioaktives Adenosin umzuwandeln (Zimmermann 1992). AMP entsteht durch die Hydrolysierung von Phosphatgruppen des Adenosin-Triphosphats (ATP) und des Adenosin-Diphosphats (ADP) durch ATP- oder ADP-asen. Ein Beispiel einer solchen ATP-ase ist die Ektoapyrase CD39. CD73 spaltet im Folgenden, durch einen Dephosphorylierungsschritt, AMP zu Adenosin. Das so entstandene extrazelluläre Adenosin kann durch die Adenosindeaminase (CD26) zu Inosin abgebaut werden, welches wiederum zu Hypoxanthin umgesetzt wird.

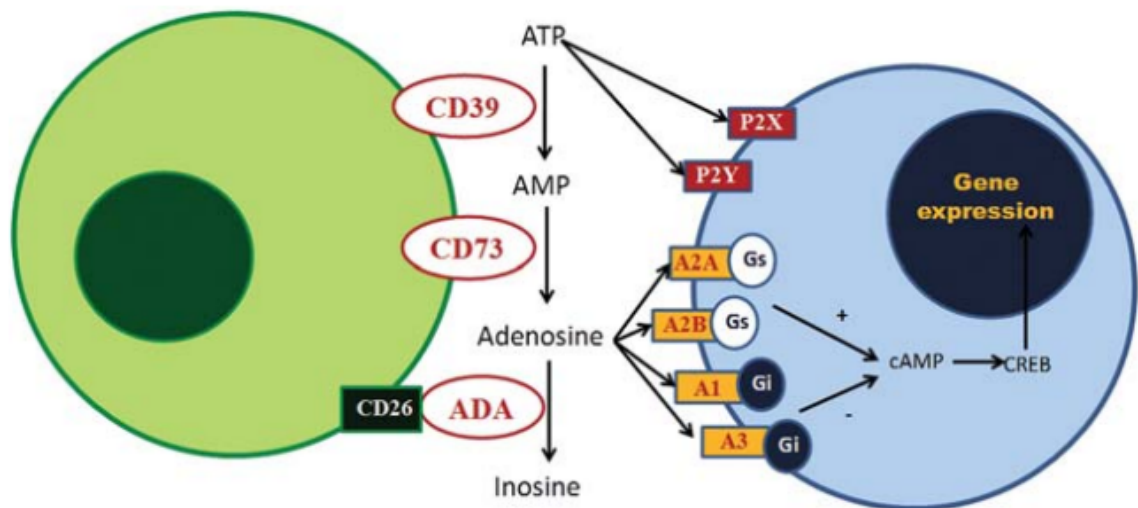


Abb. 2: Metabolismus des extrazellulären Adenosins (Regateiro, Cobbold et al. 2013)

Die Abbauschritte von ATP über ADP bis hin zu AMP sind durch die Aktivität von extrazellulären Nukleosid-Diphosphat-Kinasen und Adenylat-Kinasen umkehrbar. Der durch CD73 katalysierte Schritt von AMP zu Adenosin ist jedoch nicht reversibel. Dies bedeutet, dass CD73 das Verhältnis zwischen extrazellulärem ATP und Adenosin kontrolliert (Szabo and Pacher 2012).

Adenosin kann, neben der AMP-Hydrolyse durch CD73, auch intrazellulär entstehen. Endogenes AMP kann durch alkalische Phosphatasen zu Adenosin dephosphoryliert werden und durch spezifische bidirektionale Nukleosidtransporter in den Extrazellularraum befördert werden (Williams and Jarvis 1991; Anderson, Xiong et al. 1996; Baldwin, Schertler et al. 1997; Aymerich, Duflot et al. 2005; Gorlach 2005). Intrazelluläres Adenosin kann darüber hinaus durch die Hydrolyse von S-Adenosyl-Homocystein gewonnen werden.

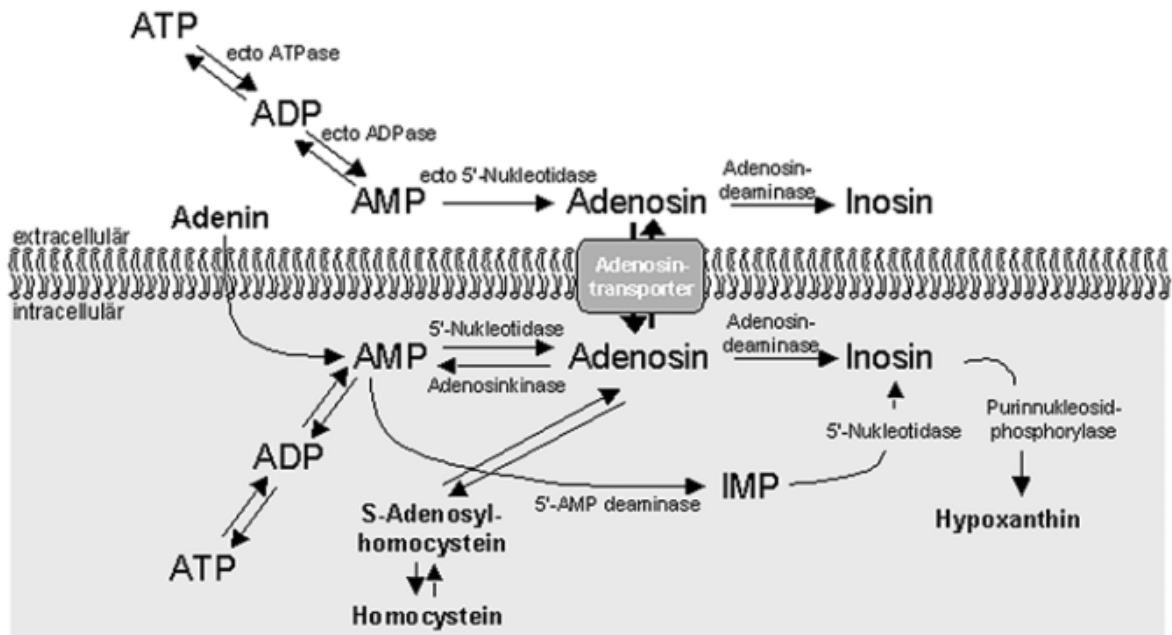


Abb. 3: Auf-und Abbaukaskade des Adenosins (Schulte 2004)

1.2.1 Renale Bedeutung von Adenosin und Adenosinrezeptoren

Die Wirkung von Adenosin wird durch die Aktivierung von vier verschiedenen Typen G-protein-gekoppelter, 7-transmembran-durchspannender Purinrezeptoren (P1-Rez.), AR-A1, AR-A2a, AR-A2b und AR-A3, vermittelt (Linden 2001). Zunächst wurden die Adenosinrezeptoren aufgrund ihrer gegensätzlichen Wirkungen auf die intrazelluläre cAMP Produktion in A1 und A2 Rezeptoren gruppiert. Daraufhin folgte die Einteilung in einen hochaffinen AR-A2b und einen niedrigaffinen AR-A2a. Der AR-A3 wurde als letztes Mitglied identifiziert. Heute werden die einzelnen Rezeptoren anhand der mit ihnen assoziierten G-Protein-Untereinheiten (Guaninnukleotid-bindendes oder GTP-bindendes Protein) und der daraus resultierenden intrazellulären Signalmechanismen unterschieden (Vallon, Muhlbauer et al. 2006).

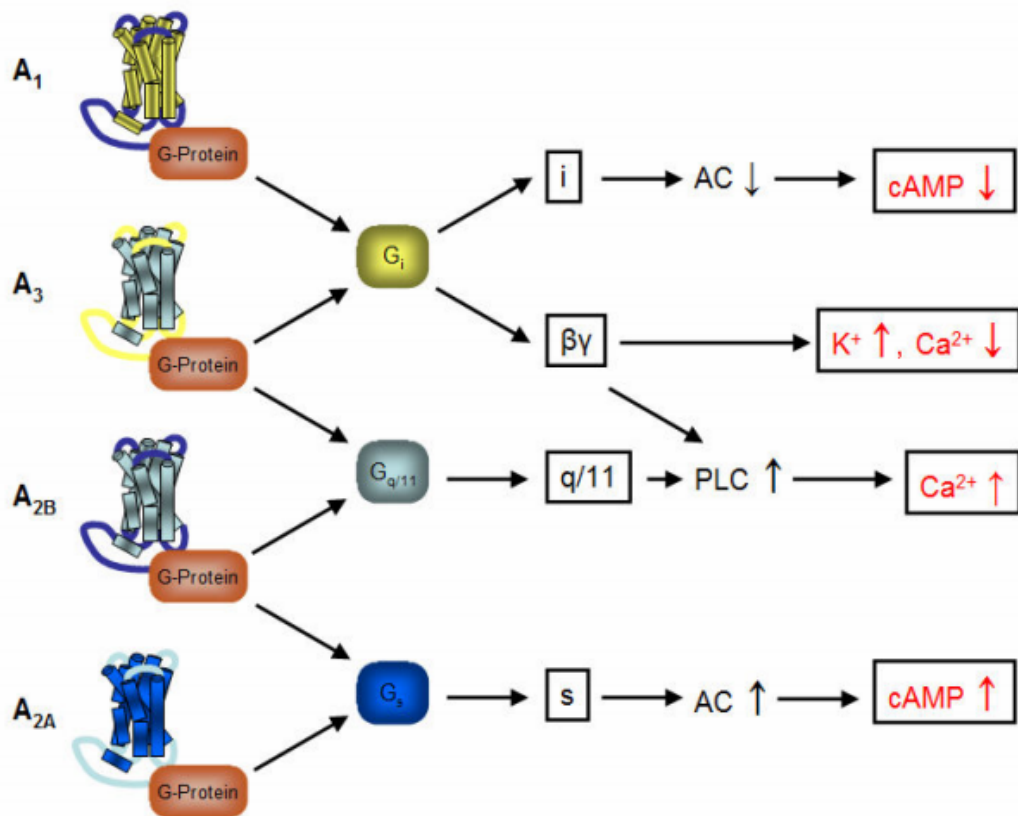


Abb. 4: Adenosinrezeptoren und ihre Signalwege (Romio 2010)

Zusammenfassend regulieren Adenosinrezeptoren die cAMP-Konzentration und die davon abhängigen Signalwege. Dabei wirken sie positiv über G_s und negativ über G_i-Proteine. Zyklisches AMP (cAMP) ist ein zentraler intrazellulärer Second Messenger, der dafür bekannt ist in erhöhten Konzentrationen einen antiinflammatorischen und gewebesetzenden Effekt zu besitzen (Erdogan, Aslantas et al. 2008). Dabei wird die cAMP-Konzentration über die Aktivität der Adenylzyklase (AC), die ATP in cAMP umwandelt und die Aktivitäten von cAMP-spezifischen Phosphodiesterasen, die für den cAMP-Abbau verantwortlich sind, reguliert. Die Aktivität dieser Enzyme wird wiederum durch die G-Proteinuntereinheiten der Adenosinrezeptorkomplexe gesteuert.

G_i und G_q gekoppelte Rezeptoren können neben der Steuerung verschiedener Ionenkanäle auch die Phospholipase C (PLC) aktivieren. Diese führt bei Aktivierung zur Produktion von Diacylglycerol und Inositoltriphosphat und somit zu einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺ Konzentration und zu einer Aktivierung der Proteinkinase C.

Bei den Rezeptoren A1 und A3 handelt es sich um Gi-gekoppelte Membranproteine, wohingegen der A2a- und der A2b-Rezeptor Gs-gekoppelt sind (Pierce, Furlong et al. 1992; Olah 1997). Adenosinrezeptoren können auch an weitere G-Proteine gekoppelt sein. So können A2b- und A3-Rezeptoren zum Beispiel auch mit Gq assoziiert vorliegen (Palmer, Benovic et al. 1995; Palmer, Gettys et al. 1995; Gao, Chen et al. 1999; Linden, Thai et al. 1999). Die Aktivierung der A1-, bzw. A3-Rezeptoren verhindert durch die Hemmung der Adenylylzyklase die cAMP- Bildung. Die AR-A1 und AR-A3-Aktivierung besitzt somit ein proinflammatorisches Potential. Eine Aktivierung des AR-A2a, der eine Gas- Untereinheit besitzt, wirkt dagegen stimulatorisch auf die Adenylylzyklase und fördert somit die Bildung von cAMP. *In vivo* Experimente zeigten, dass der Einsatz eines AR-A2a Agonisten, den mittels Ischämie und Reperfusion induzierten Nierenschaden reduziert und bestätigten somit eine antiinflammatorische Wirkung für AR-A2a (Okusa, Linden et al. 1999). Der AR-A2b kann ebenfalls über eine Gas-Untereinheit die intrazellulären cAMP-Konzentration steigern. Eine Aktivierung des AR-A2b kann außerdem genauso wie eine Aktivierung des AR-A3 zu einer vermehrten Aktivität der Phospholipase C (PLC) führen. Dies resultiert in einem Anstieg des intrazellulären Ca²⁺ Spiegels, der über die Gαq/11-Untereinheit vermittelt wird. Diese erhöhte Ca²⁺ Konzentration führt unter anderem zu einer Aktivierung von T-Lymphozyten. Somit wird den AR-A2b und AR-A3 ebenfalls ein proinflammatorisches Potential zugeschrieben.

Adenosin besitzt häufig eine zu ADP und ATP entgegengesetzte Wirkung. Diese Nukleotide fördern die Plättchenaktivierung und Aggregation, wohingegen Adenosin diese Prozesse hemmt (Born 1962). Diese hauptsächlich antiinflammatorischen Effekte gehen überwiegend auf die Aktivierung der Adenosin A2-Rezeptoren zurück.

Es ist bekannt, dass die Adenosinrezeptoren auch andere Signalwege, neben dem cAMP-Weg, aktivieren können, wie z.B. den mitogenaktivierten Proteinkinaseweg (MAPK), den Phosphoinositid 3-Kinaseweg oder den Epac-Signalweg (exchange proteins activated by cAMP) (Hasko, Linden et al. 2008).

Neben den verschiedenen Signalwegen zeigen die einzelnen Adenosinrezeptoren auch unterschiedliche Affinitäten zu Adenosin. Der AR-A1 und der AR-A2a werden bereits in Konzentrationsbereichen von 10- 100 nM aktiviert, die Rezeptoren A2b

und A3 benötigen hingegen 1000fach höhere Adenosinkonzentrationen zur Aktivierung (Fredholm, Abbracchio et al. 1994). Die Adenosinkonzentrationen liegen unter normalen Bedingungen im extrazellulären Raum des Menschen um die 3,2 μM , im intrazellulären Raum um die 1,8 μM . (Traut 1994; Lasley, Hegge et al. 1998). Unter hypoxischen Bedingungen steigt die interstitielle Adenosinkonzentration im Gewebe stark an (Siaghy, Devaux et al. 2000; MacLean, Vickery et al. 2001). Dadurch können auch die niedrigaffinen Adenosinrezeptoren aktiviert werden. Die Veränderungen des extrazellulären Adenosinlevels werden v.a. durch die Aktivität der Nukleosidtransporter bestimmt, welche wiederum vom Adenosinkonzentrationsgradienten zwischen dem Intra- und Extrazellularraum, oder der Transporterexpression selbst, abhängig sind (Baldwin, Beal et al. 2004).

Extrazelluläres Adenosin wird über Nukleosidtransporter ins Zytosol aufgenommen oder über die Adenosindeaminase bzw. die Adenosinkinase verstoffwechselt (Snyder and Henderson 1973). Inhibition der Adenosindeaminase oder -kinase führten *in vivo* zu einer Erhöhung der extrazellulären Adenosinkonzentration, sowie zu einer verzögerten Entzündungsreaktion. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass eine Inhibition der Nukleosidtransporter eine Verminderung der LPS induzierten TNF- α Antwort bei Mäusen hervorruft (Noji, Takayama et al. 2002). Demnach hat sowohl eine Hemmung des intrazellulären Adosintransports, als auch ein verringerter Abbau des extrazellulären Adenosins eine antiinflammatorische Wirkung zur Folge.

1.2.2 Renale Funktion von CD73-defizienten Mäusen

CD73 wird in der Niere von glomerulären Mesangialzellen im Bürstensaum der frühen Schleifen des proximalen Tubulus, im cortikalen, geraden Teil des proximalen Tubulus, sowie in Teilen des distalen Tubulus exprimiert (Le Hir and Kaissling 1993; Castrop, Huang et al. 2004; Huang, Vallon et al. 2006). Außerdem findet man CD73 in interstitiellen Fibroblasten. CD73- positive Fibroblasten befinden sich unter normoxischen Bedingungen nur im Cortex und nicht in der Medulla.

CD73 ist hier vor allem für die Bereitstellung des extrazellulären Adenosins verantwortlich. Die Relevanz von CD73 und dem extrazellulären Adenosin in

Bezug auf die Nierenfunktion wurde durch Experimente an CD73-defizienten Mäusen bestätigt. CD73-KO Tiere zeigten eine veränderte Antwort auf gesteigerte tubuläre Perfusionsflussraten. Dabei wurde in CD73^{-/-} Mäusen ein niedrigerer Abfall bezüglich der Stop-Flow-Drücke und der GFR in oberflächlichen Nephrons gemessen. (Ein Stop-Flow-Druck wird in einem blockierten proximalen Tubulus durch Mikropunktion bestimmt und dient als indirektes Maß für den glomerulären Kapillardruck). Die geringen Drücke und Filtrationsraten sprechen dafür, dass eine Gegenregulation durch das tubuloglomeruläre Feedback bei CD73-defizienten Tieren ausgeblieben oder zumindest unzureichend aufgetreten ist. An isolierten afferenten Arteriolen wurde überprüft, ob dieser Befund im Zusammenhang mit einer verminderten Vasokonstriktion, aufgrund einer reduzierten Adenosinantwort, steht. Dies bestätigte sich nicht, da isolierte, afferente Arteriolen aus CD73-KO Mäusen eine normale Kontraktilität bei Stimulierung durch Adenosin aufwiesen. Das niedrige TGF der CD73-defizienten Tiere wurde durch den Verlust der enzymatischen CD73-Aktivität und einer daraus resultierenden verringerten extrazellulären Adenosinkonzentration erklärt (Castrop, Huang et al. 2004). Hinsichtlich des renalen Blutflusses, des renalen vaskulären Widerstands, der Reninsekretion nach Furosemidstimulation, der Plasma Osmolarität oder der Plasma Konzentrationen an Na⁺, Cl⁻, BUN, Kreatinin, Harnsäure und Gesamtprotein konnten keine Unterschiede zwischen CD73-KO und WT Tieren gefunden werden.

1.2.3 Untersuchungen zur pathophysiologischen Rolle von CD73

Die *in vivo* Bedeutung von CD73 als Schalterpunkt innerhalb entzündlicher Prozesse wurde bereits in mehreren Studien an CD73-defizienten Mäusen untersucht. Dabei waren die Ergebnisse hinsichtlich des Einflusses der CD73-Aktivität auf die Immunmodulation inkonsistent. In einigen Modellen konnte eine entzündungsfördernde und in anderen eine entzündungshemmende Wirkung von CD73 beobachtet werden. Beispiele für eine proinflammatorische Antwort auf einen CD73-Ausfall konnten im Zusammenhang mit einer verstärkten Entwicklung von Arteriosklerose, chronischem Herzversagen, Lungenentzündungen oder chronischen Darmerkrankungen festgestellt werden (Koszalka, Ozuyaman et al. 2004; Volmer, Thompson et al. 2006; Zerneck, Bidzhekov et al. 2006; Eckle,

Fullbier et al. 2007; Jalkanen and Salmi 2008; Louis, Robinson et al. 2008). Im Gegensatz dazu belegen Studien der allergen-induzierten Luftwegshyperreaktivität oder der Entwicklung von hepatischer Fibrose, dass ein CD73-Knockout im beschriebenen Modell zu einer Abschwächung des Krankheitsverlaufs führt (Peng, Fernandez et al. 2008; Schreiber, Castrop et al. 2008). Des Weiteren scheint CD73 einen starken negativen Einfluss auf das Tumorstadium im Beispiel von Brustkrebserkrankungen zu besitzen (Stagg, Divisekera et al. 2010; Stagg, Divisekera et al. 2011). Dem durch CD73 produzierten Adenosin wird hierbei eine hemmende Wirkung auf die endogene Antitumor-Immunantwort zugeschrieben, welche ein vermehrtes Tumorstadium zur Folge hat (Wang, Fan et al. 2011).

1.2.4 Pharmakologische Bedeutung von CD73

Um die Adenosinwirkung zu modulieren wurden bislang vor allem Therapeutika eingesetzt, die die Aktivität des Adenosinrezeptors als Agonisten oder Antagonisten regulieren. Als Alternative dazu könnte auch die Regulation der extrazellulären Adenosinkonzentration als geeigneter Angriffspunkt dienen. Jedoch ist bislang unklar, ob eine Modulation der extrazellulären Adenosinkonzentration die intrazelluläre Entstehung von Adenosin beeinflussen könnte. Demnach könnte eine gehemmte extrazelluläre Adenosinproduktion, durch eine gesteigerte intrazelluläre Adosinherstellung und einen nachfolgend gesteigerten Transport in den Extrazellularraum, die verminderte extrazelluläre Adosinkonzentration kompensieren. Eine Strategie um die extrazelluläre Adosinkonzentration, in Abhängigkeit von einer erhöhten CD73-Aktivität, zu steigern, ist die Verwendung einer löslichen Nukleotidase. Im Hypoxiemodell wird die vaskuläre Barrierefunktion, durch eine Entzündung im Gewebe, geschwächt. Unter Zugabe der löslichen Form von CD73 wurde eine geringere Akkumulation neutrophiler Zellen und somit eine verminderte Entzündungsreaktion festgestellt (Eltzschig, Thompson et al. 2004; Thompson, Eltzschig et al. 2004). Eine Limitierung finden diese Anwendungen jedoch darin, dass bisher noch keine verlässliche Quelle für das aufgereinigte CD73-Protein gefunden wurde. In Studien wurde das Gift der Klapperschlange dafür vorgeschlagen (Aird 2005).

Therapien, die ausschließlich auf die CD73-Aktivität abzielen, konnten jedoch bislang nicht zufriedenstellend etabliert werden.

Als Inhibitor für CD73 wurde vor allem das $\alpha\beta$ -Methylen-ADP (APCP) im Mausmodell beschrieben (Synnestvedt, Furuta et al. 2002; Eltzschig, Thompson et al. 2004; Thompson, Eltzschig et al. 2004). APCP wird hier als gut verträglich, als oral-aufnahmefähig und in Konzentrationen bis zu 60 mg/kg/Tag als nicht-toxisch charakterisiert. Obwohl die meisten veröffentlichten Studien dem durch CD73 produzierten Adenosin einen vorteilhaften Effekt zuschreiben, gibt es auch Beispiele einer negativen Adenosinwirkung, wie sie im Zusammenhang mit der Entwicklung von hepatischer Fibrose beschrieben wird (Peng, Fernandez et al. 2008). Diese Studie beschreibt Experimente an CD73-defizienten Mäusen, die toxin-induziert eine Leberfibrose entwickelten. Im Vergleich zu WT Tieren wurde hier in Lebern aus CD73-KO Mäusen ein geringerer Proteingehalt an Collagen und α SMA detektiert. Des Weiteren, waren die mRNA-Level für Collagen 1 und 3, sowie für TGF- β , stärker im Lebergewebe von WT-als von CD73-KO Mäusen erhöht. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Tiere in Abwesenheit von CD73 einen mildereren Grad an hepatischer Fibrose erreichten und sich somit die CD73-Defizienz protektiv gegenüber der Fibroseentwicklung darstellte.

Somit kann auch ein möglicher Anwendungsbereich für Hemmstoffe der Ekto-5'-Nukleotidase postuliert werden.

1.3 Nicht-enzymatische Funktionen von CD73

Unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen wird CD73 neben den genannten Zellen der Niere auch von verschiedenen Zelltypen, die dem Knochenmark entstammen, exprimiert (Zimmermann 1992; Resta, Hooker et al. 1997; Airas, Niemela et al. 2000; Bianchi and Spsychala 2003). CD73 konnte zudem auf verschiedenen Arten von Leukozyten, wie auf B-Lymphozyten, CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen nachgewiesen werden (Thompson, Ruedi et al. 1986).

Im Zusammenhang mit einer Expression auf der Zelloberfläche, wurde die Ekto-5'-Nukleotidase auch als Co-Rezeptor in der T-Zellaktivierung und als Zelladhäsionsmolekül beschrieben (Mlodzik, Loffing et al. 1995; Resta, Hooker et al. 1997; Bianchi and Spsychala 2003). Studien in denen Antikörper gegen CD73

verwendet wurden zeigten, dass eine Antikörperbindung die Proliferation und Produktion von IL-2, sowie die Expression von IL-2-Rezeptoren in T-Lymphozyten auslöst (Resta and Thompson 1997). Hierbei spielt die enzymatische Aktivität von CD73 eine untergeordnete Rolle, wobei der genaue molekulare Prozess der CD73-abhängigen T-Zell-Aktivierung bisher noch nicht aufgeklärt werden konnte. Jedoch wird eine Bindung eines noch unbekannten Liganden an CD73 als möglicher Mechanismus vorgeschlagen. Nach Ligandenbindung könnte CD73 schließlich mit T-Lymphozyten über den T-Zell-Rezeptor-Komplex interagieren (Resta and Thompson 1997). Als weitere Fähigkeit von CD73 wurde eine CD73-abhängige Bindung von Lymphozyten an das Endothel beschrieben. In Zellkultur zeigten mit CD73-cDNA-transfizierte COS-Zellen eine deutlich erhöhte Adhäsion an Endothelzellen, als Kontrollansätze (Airas, Hellman et al. 1995). Auch hier konnte der genaue Mechanismus noch nicht aufgeklärt werden.

1.4 Die Entwicklung der renalen Fibrose

CD73 steht in Zusammenhang mit der Entwicklung verschiedener entzündlicher Krankheiten, wie der hepatischen Fibrose. Daher ist es von großer Bedeutung zu klären, ob CD73 ebenfalls eine Rolle in der Vermittlung fibrotischer Erkrankungen innerhalb anderer Organe besitzt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Ausbildung einer renalen Fibrose im Bezug auf die CD73-Expression untersucht. Im Folgenden sollen zunächst die grundsätzlichen, an der Fibrogenese beteiligten Mechanismen erklärt werden.

Eine renale Fibrose entsteht durch eine massive Verletzung des Nierengewebes, welche zunächst den allgemeinen Wundheilungsprozess und eine Entzündungsreaktion auslöst und schließlich in einer krankhaften Vermehrung des Bindegewebes endet. Die Aufgabe der Wundheilung ist zunächst die Wiederherstellung des gesunden Gewebes und der Nierenfunktion. Kann dies nicht ausreichend erfüllt werden, da zum Beispiel der Entzündungsreiz anhaltend ist, bildet sich aufgrund der kontinuierlich ablaufenden Regenerationsprozesse, Narbengewebe (Liu 2011). Die renale Fibrose ist ein irreversibler Vorgang, welcher bei progredientem Verlauf zum Nierenversagen führt.

Bei der Entstehung der Fibrose ist eine Vielzahl verschiedener Zellen beteiligt. Dazu gehören fast alle Zellen der Niere, wie interstitielle Fibroblasten, tubuläre Epithelzellen, Perizyten, vaskuläre Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Mesangialzellen, sowie einwandernde zirkulierende Zellen, wie Lymphozyten, Makrophagen und Fibrozyten. Diese Varianz der beteiligten Zellen spiegelt auch die Komplexität des Prozesses wider. Einige Zelltypen wirken dabei aktivierend auf die Fibrogenese, indem sie Zytokine oder Chemokine ausschütten. Andere Zellen werden wiederum durch diese Botenstoffe zur Produktion extrazellulärer Matrix stimuliert. Die einzelnen Effekte zerstören nach und nach das renale Parenchym und setzen somit die Nierenfunktion herab. Dieser als Fibrogenese bezeichnete Vorgang kann in vier Phasen unterteilt werden. Die Phasen werden als Prägung (Priming), Aktivierung (Activating), Umwandlung (Exekution) und Progression bezeichnet (Eddy 2000; Liu 2006).

- **Prägungsphase:** Eine anhaltende Gewebeschädigung bzw. ein anhaltender Entzündungsreiz führt zu einer Aktivierung von Fibroblasten die zur Ausschüttung von Zytokinen wie TGF- β angeregt werden.
- **Aktivierungsphase:** Fibroblasten und Myofibroblasten werden durch Zytokine zur Produktion von extrazellulärer Matrix aktiviert.
- **Umwandlungsphase:** Die Fibrogenese manifestiert sich indem weitere Zellspezies rekrutiert werden und sich diese in einen matrixproduzierenden Phänotyp differenzieren.
- **Progressionsphase:** Die fibrogenetischen Ereignisse, wie der Anstieg an ECM, der Verlust an Parenchym oder das Entstehen einer Hypoxie, etc. wirken sich auf die renale Funktion aus, die sich deutlich verschlechtert und schließlich in einem Nierenversagen resultiert.

Abb. 5: 4 Phasen der Fibrogenese (Liu 2011)

1.4.1 Molekulare Mechanismen der Fibrogenese

Neben einer mechanischen Verletzung, können auch systemische Stimuli eine Entzündung hervorrufen. Diese sind zum Beispiel eine Proteinurie, Hypoxie, oder erhöhte Konzentrationen an TGF- β , Angiotensin II oder Glukose (Liu 2011). Als Antwort werden daraufhin inflammatorische Zytokine wie TGF- β , TNF- α , MCP-1 oder CCL-5/RANTES freigesetzt, welche chemotaktisch auf infiltrierende inflammatorische Zellen wirken und diese richtungsweisend anlocken (Chung and Lan 2011). Zu diesen Zellen gehören, Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen, dendritische Zellen und Mastzellen (Nathan and Ding 2010; Schroder and Tschopp 2010). Des Weiteren werden diese Zellen im entzündeten Gewebe weiter aktiviert und produzieren Moleküle, wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die das Gewebe weiter zerstören. Außerdem können diese Zellen die Produktion weiterer fibrogener Zytokine und Wachstumsfaktoren induzieren (Ricardo, van Goor et al. 2008; Duffield 2010; Vernon, Mylonas et al. 2010; Vielhauer, Kulkarni et al. 2010). Der Anstieg der profibrotischen Zytokine aktiviert Fibroblasten und tubuläre Epithelzellen zu einer phänotypischen Umwandlung, nach der sie große Mengen an ECM-Bestandteilen produzieren.

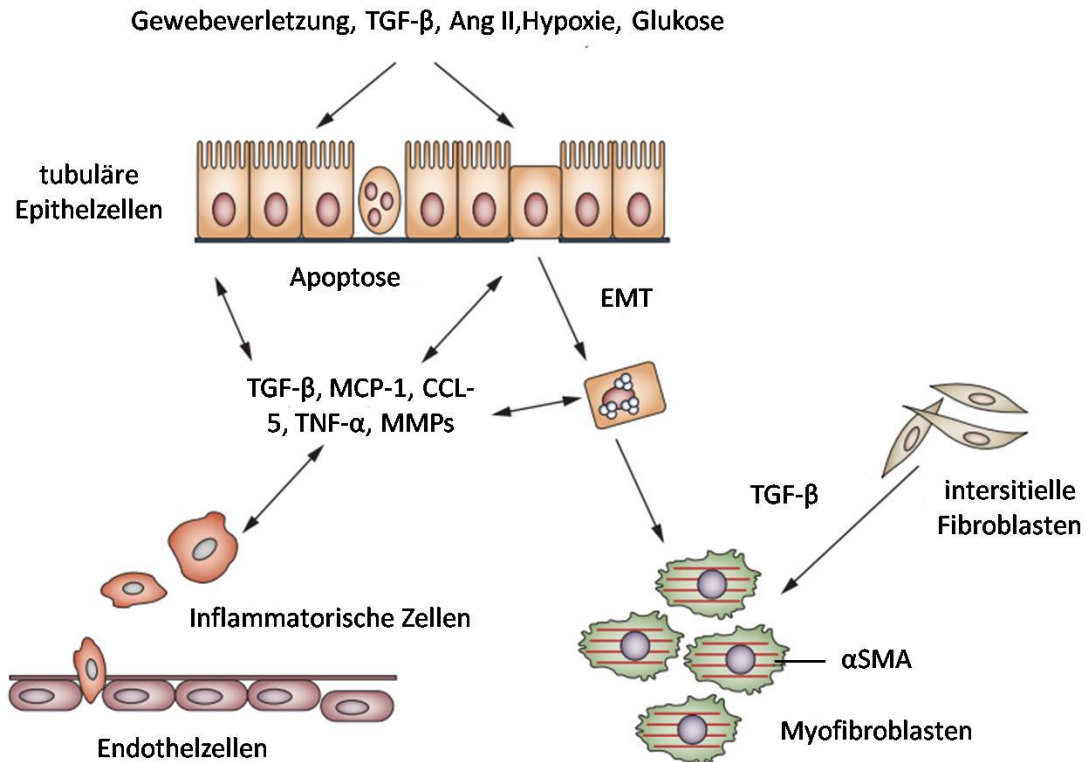


Abb. 6: Vermittlung zellulärer Ereignisse während der Fibrogenese (Liu 2011)

1.4.2 Beteiligung von zirkulierenden hämatopoetischen Zellen an der Fibrogenese

Eine zentrale Rolle bei der fibrotischen Zellaktivierung spielen die T-Lymphozyten. Diese vermitteln die Einwanderung von Monozyten und Makrophagen und die Differenzierung von Monozyten zu Fibrozyten. CD4⁺ T-Lymphozyten kontrollieren dabei die Differenzierung von zirkulierenden Monozyten zu Collagen-produzierenden Fibrozyten. *In vitro* differenzierten sich CD11b⁺, CD155⁺, Gr1⁺ Monozyten, die zusammen mit CD4⁺ T-Lymphozyten inkubiert wurden, zu Fibrozyten. Diese Differenzierung blieb in Abwesenheit von CD4⁺ T-Lymphozyten aus (Niedermeier, Reich et al. 2009). Eine Aktivierung der T-Lymphozyten induzierte wiederum die Ausschüttung von IL-2, TNF-α und IFN-γ, welche eine Differenzierung, sowie das Wachstum der Fibrozyten hemmte. Somit steht die Fibrozytendifferenzierung unter direkter Kontrolle von CD4⁺ T-Lymphozyten und ist außerdem abhängig von deren Aktivierungszustand.

Fibrozyten sind neben der Produktion von ECM-Molekülen auch zur Produktion von verschiedenen Zytokinen fähig. Dabei unterscheidet sich das Zytokinprofil von Fibrozyten von dem von Monozyten, T-Lymphozyten, Endothelzellen oder Fibroblasten. Fibrozyten produzieren Collagen I und III, Fibronektin, Vimentin, den hämatopoetischen Stammzellmarker CD34 und das Leukozytenantigen CD45 (Bucala 2012). Außerdem besitzen Fibrozyten eine eigene spindelförmige Morphologie mit Zellfortsätzen in der Größe zwischen Pseudopodien und Mikrovilli (Bucala, Spiegel et al. 1994). Hohe Spiegel an IL-1 β , welches während der Entzündungsreaktion und der Monozytenaktivierung ausgeschüttet wird, induzieren Fibrozyten wiederum zur Sekretion von TNF α , IL-6 und dem Makrophagen-inflammatorischen-Protein (MIP-1 α,β) (Chesney, Metz et al. 1998). Somit besitzen Fibrozyten neben der Fähigkeit zur ECM-Produktion ebenfalls die Fähigkeit zur Regulation der Fibrogenese.

1.4.3 Beteiligung ortsständiger Zellen des Nierengewebes an der Fibrogenese

Neben zirkulierenden, hämatopoetischen Zellen, spielen auch tubulointerstitielle Zellen eine entscheidende Rolle bei der Fibrogenese. Dabei werden vor allem Fibroblasten als hauptsächliche Quelle der ECM-Produktion angesehen. Fibroblasten erzeugen Fibronektin, Collagen I und III, sowie α glattes-Muskel-Aktin (α SMA = α -smooth-muscle-actin). Neben ortsständigen interstitiellen Fibroblasten, können auch weitere Zellpopulationen zur Differenzierung in einen fibroblastenähnlichen Phänotyp, in sogenannte Myofibroblasten angeregt werden. Dabei gibt es verschiedene Theorien aus welchen Geweben die zur Differenzierung aktivierten Zellen stammen können (Grande and Lopez-Novoa 2009; Meran and Steadman 2011; Schrimpf and Duffield 2011). ECM-produzierende Zellen können demnach durch eine Aktivierung von interstitiellen Fibroblasten, durch eine Differenzierung von Perizyten, durch eine Umwandlung der tubulären Epithel- oder Endothelzellen oder durch die Rekrutierung zirkulierender Fibrozyten entstehen (Barnes and Gorin 2011). Die jeweilige Beteiligung und sogar die Existenz der einzelnen Myofibroblastenvorläuferzellen werden nach wie vor kontrovers diskutiert. Die Schwierigkeit, Klarheit in die Frage

der Herkunft von Myofibroblasten zu bringen, besteht hauptsächlich darin, dass es bisher nicht gelungen ist, spezifische Fibroblastenmarker zu entwickeln, die eine genaue Identifikation und Überwachung dieser Zellspezies ermöglichen würden. Des Weiteren ist es ein großes Problem, dass Fibroblasten eine große phänotypische Heterogenität aufweisen, was ebenfalls auf einen unterschiedlichen Ursprung der Zellen hindeutet. Außerdem ändern Fibroblasten ihren Phänotyp im Bezug auf ihren Aktivierungsstatus, die Lokalisation und den Grad an renaler Fibrose (Liu 2011).

In der gesunden, adulten Niere befinden sich Fibroblasten im interstitiellen Raum zwischen den Blutkapillaren und dem Epithelium und formen ein Netzwerk aus renalem Parenchym, das zur Stabilisierung der Gewebestruktur dient. Morphologisch sind diese Zellen sternförmig und besitzen ein großes rauhes endoplasmatisches Retikulum, collagenspeichernde Granula und Aktinfilamente (Kaissling and Le Hir 2008). Im Ruhezustand exprimieren Fibroblasten CD73 in der Plasmamembran und produzieren Erythropoietin (EPO) sowie das Fibroblasten-spezifische-Protein (FSP-1 oder S100A4), das mit dem Zytoskelett assoziiert ist (Grigorian, Ambartsumian et al. 2008; Boye and Maelandsmo 2010; Zeisberg and Neilson 2010). Fibroblasten sind in der gesunden Niere vor allem für die Aufrechterhaltung der interstitiellen Matrix-Homöostase verantwortlich und geben kontinuierlich ein basales Level an ECM ab. Nach fibrotischer Aktivierung wird diese ECM-Produktion gesteigert und sie geben ebenfalls α SMA ab. Auch Myofibroblasten generieren α SMA und ähneln somit stark interstitiellen Fibroblasten und glatten Muskelzellen, da sie durch das gebildete α SMA auch eine Kontraktilität besitzen. α SMA wird häufig als Fibroblastenmarker verwendet. Dies ist deshalb problematisch, da α SMA auch von vaskulären, glatten Muskelzellen exprimiert wird. Zudem produzieren Myofibroblasten α SMA nicht kontinuierlich (Strutz and Zeisberg 2006; Hinz, Phan et al. 2007; Wynn 2007; Grande and Lopez-Novoa 2009). Neben der schwierigen Rolle des α SMA als spezifischer Zellmarker, korreliert dessen Proteingehalt im Gewebe aber dennoch mit dem Schweregrad einer renalen Fibrose und spiegelt somit den Abfall der Nierenfunktion wider (Hewitson 2009). Das aktinbindende FSP-1 wurde zunächst als spezifischer Fibroblastenmarker angesehen. Dieses Protein konnte jedoch auch in CD45+ Leukozyten nachgewiesen werden und scheidet somit ebenfalls als spezifischer Marker aus.

Eine der meist umstrittenen Theorien bezüglich der Herkunft von matrixproduzierenden Zellen, ist die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT). Hierbei sollen Zellen aus dem tubulären Epithel zu einer phänotypischen Umwandlung angeregt werden. Ein ähnlicher Mechanismus wird bezüglich endothelialer Blutgefäßzellen vorgeschlagen, bei dem sich diese zu Myofibroblasten differenzieren (EndoMT). Jedoch wird an der Beteiligung der EMT und der EndoMT stark gezweifelt, da die beschriebenen Mechanismen bisher nur *in vitro* nachgewiesen wurden (Burns and Thomas 2010; Li and Bertram 2010; Liu 2010; Zeisberg and Duffield 2010; Duffield and Humphreys 2011; Kriz, Kaissling et al. 2011; Quaggin and Kapus 2011; Grgic, Duffield et al. 2012). *In vitro* verloren tubuläre Epithelzellen ihre epithelialen Merkmale und exprimierten mesenchymale Markerproteine. Dieser Prozess wurde durch Zugabe profibrotischer Zytokine, vor allem durch TGF- β stimuliert (Yang and Liu 2001; Humphreys, Lin et al. 2010). Die genaue Herkunft matrixproduzierender Zellen wird jedoch weiterhin Gegenstand der Grundlagenforschung bleiben.

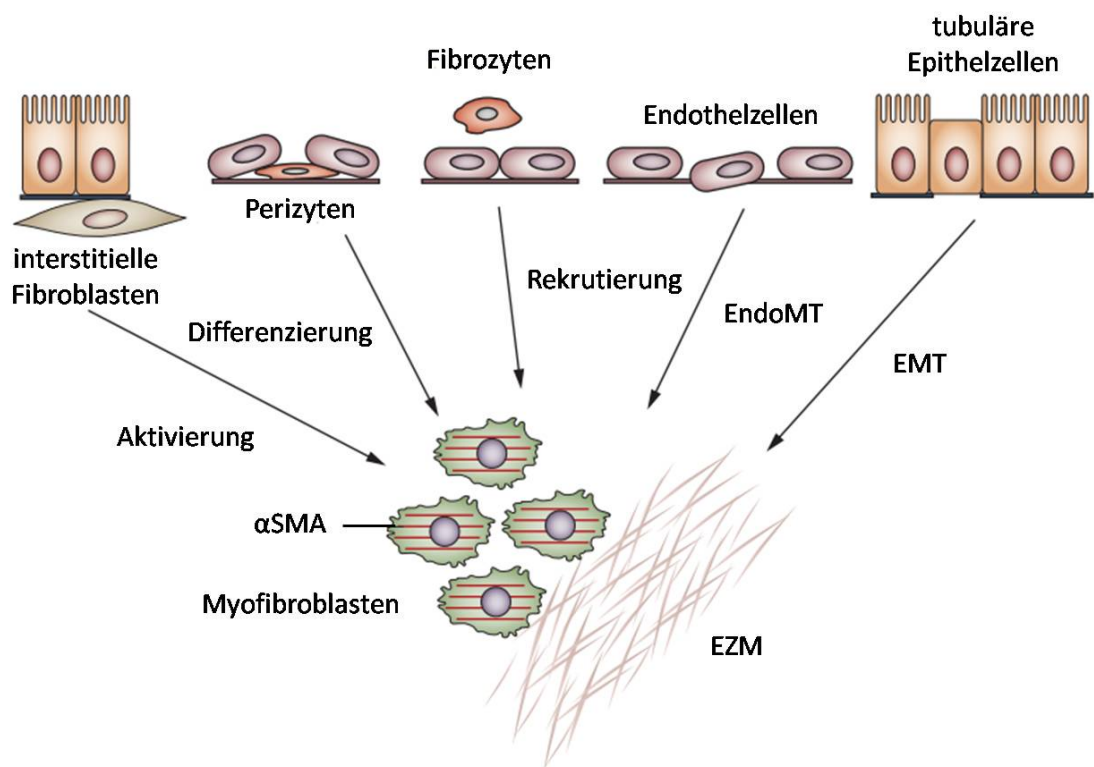


Abb. 7: mögliche Vorläuferzellen der ECM-produzierenden Zellen (Liu 2011)

1.5 Irreversible Umwandlung und Progression in der renalen Fibrose

Auch wenn die Frage nach dem genauen Ursprung fibrotisch aktiver Zellen noch nicht detailliert aufgeklärt ist, steht dennoch fest, dass aktivierte Fibroblasten und ihre Verwandten während der Fibroseentwicklung ein Übermaß an ECM produzieren und sich im Interstitium eine große Menge an collagenergen Fasern, hauptsächlich aus Collagen I, III und Fibronektin, ablagern. Fibronektin aktiviert im späteren Verlauf der Fibrogenese Integrine, die mit Procollagen co-lokalisieren und mit diesem ein lockeres Baugerüst für das sich anlagernde fibrilläre Collagen bilden. Dieser Prozess wird gefolgt von der Produktion weiterer, neuer Matrixproteine, wie dem Collagen IV (Eddy 2005). Während der frühen Phase der renalen Fibrose, kann die Collagenmatrix leicht durch Proteolyse, vermittelt durch Matrix-Metalloproteinasen (MMP), abgebaut werden. Dies macht die Fibrose zunächst zu einem gewissen Grad reversibel. Bis zu diesem Grad, ähneln die Vorgänge stark denen des Wundheilungsprozesses. Jedoch verändern sich bei andauerndem Entzündungsreiz die Matrixstrukturen. Die Matrixproteine werden zunehmend biochemisch modifiziert, wobei sie durch verschiedene enzymatische Reaktionen quervernetzt werden. Diese durch Enzyme wie die Transglutaminase oder die Lysyl-Oxidase katalysierten Vorgänge stabilisieren die Matrix und machen sie resistent gegen eine weitere proteolytische Degradation (Eddy 2005). Neben des Fortschreitens der irreversiblen Umwandlung von ECM, verändert sich auch das tubuläre Epithel, entsprechend der Dauer und des Schweregrads der Verletzung im Nierengewebe. Tubuläre Epithelzellen bilden den Großteil des renalen Parenchyms und somit das primäre Angriffsziel einer Reihe von metabolischen, immunologischen, ischämischen oder toxischen Ereignissen. Epithelzellen können darauf mit Proliferation, Autophagie, Wachstumsarrest, EMT oder Apoptose reagieren. In der fibrotischen Niere findet man häufig eine tubuläre Atrophie, die hauptsächlich durch EMT oder Apoptose entsteht. Obwohl die allgemeine Zellteilung in fibrotischem Gewebe zunimmt, vermindert sich der Anteil an epithelialen Zellen. Dafür kann ebenfalls ein Zellarrest in der G2/M-Phase nach Verletzung verantwortlich sein, der die Zellen zu einem profibrotischen Phänotyp umschaltet, in dem sie vermehrt TGF- β erzeugen (Yang, Besschetnova et al. 2010). Die zunehmende Atrophie beeinträchtigt stark die Nierenfunktion und reduziert die Effektivität der endogenen Reparaturmechanismen. Neben dem

Epithel ist von der Progression der renalen Fibrose auch das vaskuläre Endothel betroffen. Dieses verdünnt sich (microvascular rarefaction) und die Zahl an Endothelzellen schwindet. Die Ursache hinter diesem Zellverlust, wird der endothelialen mesenchymalen Transition, folglich der Differenzierung und Abwanderung von Endothelzellen, zugeschrieben. Außerdem könnte die Umwandlung von Perizyten zu Myofibroblasten zu einer Reduktion der Perizytenzahl und somit ebenfalls zu einer Destabilisierung des Endothels führen (Schrumpf and Duffield 2011). Auch eine entstehende Ischämie oder oxidativer Stress können ein Auslöser für die endotheliale Apoptose sein, die zu einer Verdünnung der peritubulären Kapillaren führt (Kelly, Burford et al. 2009; Venkatachalam, Griffin et al. 2010).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Entwicklung einer renalen Fibrose ein komplexer und dynamischer Vorgang ist, der nahezu alle Zelltypen der Niere sowie infiltrierende Zellen aus dem Knochenmark mit einbezieht. Des Weiteren sind die genauen Signalwege, durch welche diese Zellaktivierungen und Differenzierungen vermittelt und gesteuert werden, noch nicht detailliert aufgeklärt. Verschiedene Oberflächenproteine könnten hierbei eine regulatorische Rolle übernehmen und sollten daher untersucht werden, da diese potentielle Angriffspunkte der pharmakologischen Fibrosetherapie sein könnten. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der Ekto-5'-Nukleotidase (CD73) bezüglich der zellvermittelten Entstehung der renalen Fibrose im Mausmodell untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass CD73-defiziente Tiere zu großen Teilen vor einer funktionsschädigenden Nierenfibrose geschützt sind. Außerdem wurde eine Beteiligung von CD73 an der Differenzierung unterschiedlicher fibrotischer Zellen festgestellt.

2. Zielsetzung

In der Literatur wird eine Beteiligung der Ekto-5'-Nukleotidase im Zusammenhang mit der Vermittlung von Entzündungsprozessen beschrieben. Darüber hinaus haben Studien an CD73-defizienten Mäusen ergeben, dass diese im Vergleich zu WT-Tieren eine abgemilderte Form der hepatischen Fibrose oder der renalen Ischämie / Reperfusionsverletzung entwickelten. Da CD73 eine entscheidende Rolle in der Regulation der Nierenfunktion spielt, sollte in der folgenden Studie überprüft werden, ob die Ekto-5' Nukleotidase ebenfalls einen Einfluss auf den Verlauf einer renalen Fibrose besitzen könnte.

Dazu wurde in CD73-defizienten und WT Mäusen durch unilaterale Ureterligaturen eine renale Fibrose induziert und anschließend das Nierengewebe untersucht. In den fibrotischen Nieren wurden die Expression und der Gehalt an fibrotischen Markern und ECM-Molekülen bestimmt. Außerdem wurden, durch Messungen der glomerulären Filtrationsraten, Ergebnisse bzgl. der renalen Funktion gewonnen. Um nähere Informationen über den genauen Mechanismus der renalen Fibroseentwicklung, in Abhängigkeit von CD73, zu erhalten, wurde das fibrotische Nierengewebe, von CD73-KO und WT Mäusen, ebenfalls auf die zelluläre Zusammensetzung hin überprüft. Die Anzahl spezifischer, während der Fibrogenese aktiver, Zelltypen, konnte Aufschluss darüber geben, ob CD73 als Mediator der Zelldifferenzierung, während der Fibroseentwicklung, fungieren könnte. Im letzten Teil der Studie wurden Transplantationsversuche von CD73-positiven und negativen hämatopoetischen Stammzellen (hSZ) in CD73-KO und WT Mäusen durchgeführt und anschließend das fibrotische Markerprofil im Bezug auf den genetischen CD73-Hintergrund von hSZ und renalen Zellen untersucht.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Materialien und Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage	Mettler, Gießen
Autoklav	KSG Sterilisatoren GmbH, Olching
Blockcycler Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
Chirurgische Instrumente	Fine Science Tools, Heidelberg
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer FACS Aria	BD Biosciences, Heidelberg
Durchlichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Electrophoresis Power Supply EPS 310	Amersham Pharmacia Biotech, München
Elektrophoresekammern für Western Blot	BioRad, München
EMax® precision microplate reader	MWG Biotech, Ebersberg
Entwicklerapparatur	Agfa, Köln
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200M, Zeiss, Jena
Gelelektrophoresekammer für Agarosegele	Bio-Rad Laboratories, München
Gelgießstand Mini Protean 3 System	BioRad, München
Homogenisator Ultra-Turrax T25	Janke & Kunkel, Staufen
Isofluran-Verdampfer	Harvard Apparatus GmbH, Holliston, MA
Kamera	AxioCam MRm, Zeiss, Jena
Kreisschüttler AS250 3	IKA Labortechnik, Staufen

Lightcycler System Lightcycler LC480	Roche, Mannheim
Magnet OctoMACS Separator	Miltenyi Biotech, Berg. Gladbach
Magnet QuadroMACS Separator	Miltenyi Biotech, Berg. Gladbach
Maus-OP-Tisch, beheizt 08321	KE Med. Techn. Gerätebau
Maus-Restrainer Braintree scientific	Braintree, MA
Mikroskope	DMRB Leica, Wetzlar LSM 5 Exciter, Zeiss, Jena
NanoDrop® ND-1000, Nanodrop-ND-3300-Fluoreszenzspektrometer	Peqlab, Erlangen
Narkosegas-Absorber	Harvard Apparatus GmbH, Holliston, MA
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim
Pipetten (Gilson P10, P20, P100, P1000)	Gilson, Bad Camberg
Pipettierhilfe Pipetboy acu	ISB Integra Biosciences, Chur, Schweiz
pH-Meter	Knick, Berlin
Sterilbank	Heraeus, Nürnberg
Stereomikroskop	Leitz, Wetzlar
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad Sonorex RK255s	Bandelin, Schalltec, Mörfelden-Walldorf
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Eschborn
Western Blot Kammer	Bio-Rad Laboratories, München
Zentrifugen	Labofuge 400, Heraeus, Nürnberg Zentrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg Haematokrit 210, Hettich, Tuttlingen

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Hersteller
Braunülen, 26G	Kendall, Neustadt
Deckgläschen	Labonord, Mönchengladbach
Gel-Blotting-Papier (Whatman)	Schleicher & Schuell, Dassel
Glaswaren	Roth, Karlsruhe; Schott, Mainz
Handschuhe Peha soft	Hartmann, Heidenheim
Hyperfilm	Amersham, Braunschweig
Insulinspritzen BD Medical	Le Pont de Claix, Cedex, France
Kanülen	30G Henke-Sass, Wolf GmbH, Tuttlingen
Kanülen 19G	Becton Dickinson, Heidelberg
Kapillaren (0,5 µl, 1µl, 5µl Na-hep., 75 µl Na-hep.)	Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt
Light Cycler 480 Multiwell Platten 96	Roche, Mannheim
Nähseide 7-0	Resorba Wundversorgung GmbH, Nürnberg
Nitrozellulosemembran	Optitran Schleicher & Schuell, Dassel
Nylonsiebe (Cell Strainer 40, 70 µm)	BD Falcon, Le Pont de Claix, Frankreich
Objektträger, Superfrost Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen mit und ohne Filter	Sarstedt, Nümbrecht
Polystyrolröhrchen für Durchflusszytometer	BD Falcon, Le Pont de Claix, Frankreich
PP-Röhrchen 13ml mit Rundboden	Sarstedt, Nümbrecht
PreSeparationfilter	Miltenyi Biotech, Berg. Gladbach

Reagiergefäße Eppendorf-Cup (0,2ml, 0,5ml, 1,5ml, 2,0ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Separationssäulen (MS, LS Columns)	Miltenyi Biotech, Berg. Gladbach
Serologische Pipetten (5, 10, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter	Corning, New York, USA
VICRYL-Fäden 3-0	Ethicon, Norderstedt
Zellkulturplatten (96-well)	Greiner, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Produkt	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Acrylamid-Lösung (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Sigma Aldrich, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
BSA (Albumin from bovine serum)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Complete Protease Inhibitor	Roche, Mannheim
CytoFix/Cytoperm	BD Biosciences, Heidelberg
Direkt-PCR-Lyse-Reagenz	Peqlab, Erlangen
DNA-ladder, 100 bp	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
ECL-Reagenz	Amersham, Freiburg
ELISA-Kit Diagnostic	Biochem Canada, London, Ontario, Kanada
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roche Diagnostics, Mannheim

Fast Green	Sigma Aldrich, Taufkirchen
First Strand Buffer, 5x	Invitrogen, Karlsruhe
FITC-Sinistrin	
GoTaq DNA Polymerase	5 U/µl Promega, Mannheim
GoTaq Reaction Buffer Green, 5x	Promega, Mannheim
Glycerol 100%	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Hepes	Sigma Aldrich, München
Hoechst 33342	MolecularProbes/Invitrogen, Eugene, USA
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Isotone NaCl-Lösung 0,9%	B. Braun, Melsungen
Laemmli Puffer 2x	BioRad, München
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
M-MLV Reverse Transcriptase, 200 U/µl	Invitrogen, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS) 20%	BioRad, München
Nukleasefreies Wasser	GibcoBRL, Eggenstein
Oligo(dT)15 Primer, 0,5µg/µl	Promega, Mannheim
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
PCR Nucleotide Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 10 mM)	Promega, Freiburg
Picrinsäure	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Primer	Biomers.net
Proteinase K	Peqlab, Erlangen
Proteinstandard für BCA	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Sirius Red	Sigma Aldrich, Taufkirchen
SYBR® Green PCR Kit	Roche, Mannheim

Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Transferpuffer	BioRad, München
Tris USB	Cleveland, USA
TRIzol®-Reagenz	GibcoBRL, Eggenstein
Tween 20	Merck, Darmstadt

3.1.4 Zellkulturmedien und Zusätze

Produkt	Hersteller
FACSClean	BD Biosciences, Heidelberg
FACSflow	BD Biosciences, Heidelberg
FACSRinse	BD Biosciences, Heidelberg
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA, Cölbe
Hank's buffered salt solution (HBSS)	PAA, Cölbe
RPMI 1640	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
SuperBlock Blocking Buffer	Thermo scientific, Rockford, USA
Trypanblaulösung	Sigma Aldrich, Taufkirchen

3.1.5 Puffer

Bezeichnung	Inhaltsstoff	Menge
Elektrophoresepuffer	Tris/HCl pH8,3	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS 0,1 %	
	in Aqua dest.	
ELISA-Waschpuffer	PBS	1x

	Tween 20	0,05 %
MACS-Puffer	EDTA	2 mM
	BSA	0,5 %
	in PBS	
PBS (Phosphat buffered saline, 10x), pH 7,4	KH ₂ PO ₄	1,8 mM
	Na ₂ HPO ₄	10,3 mM
	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	in Aqua dest.	
Stripping-Puffer	2-Mercaptoethanol	100 mM
	SDS	2 %
	Tris/HCl, pH 6,7	62,5 mM
	in Aqua dest.	
TBS (Tris buffered saline, 10x)	Tris/HCl pH 7,6	0,2 M
	NaCl	1,37 M
	in Aqua dest.	
TBST	TBS	1x
	Tween 20	0,1 %
	in Aqua dest.	
Transferpuffer	Tris/HCl, pH 8,3	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20 %
	in Aqua dest.	
RIPA-Puffer	NaCl	137 mM
	KCl	3 mM
	Tris-HCl	25 mM pH 7,5

	NP40	1%
	Natriumdeoxycholat	0,5%
	SDS	0,1%
	PMSF (kurz vor Gebrauch)	0,1M

3.1.6 Antikörper

Spezifität	Herkunft	Hersteller
α SMA	Maus	Abcam
CD11b	Ratte	BD Biosciences, San Jose, USA
CD45	Maus	BD Biosciences, San Jose, USA
F4/80	Kaninchen	Abcam
Fibronektin	Kaninchen	Abcam
Collagen I	Kaninchen	BD Biosciences, San Jose, USA

3.1.7 Primersequenzen

Gen	Primer for 5' à 3'	Primer rev 5' à 3'
CD73	caaattccacacaaccactg	tgctcacttggtcacaggac
α SMA	actgggacgacatggaaaag	catctccagagtccagcaca
Fibronectin	tccagccccaccctacaagt	ccagaccaaaccataagaac
TGF- β	cttcagctccacagagaagaact	tgtgtccagggtccaaatatag
CCL-5	cctcacatattggctcggac	acgactgcaagattggagca
Ki67	cctgcccgaccctacaaaat	tccgccgtcttaaggtagga
MMP-2	tcgcccattcatcaagttccc	gccagtagaggggggtcagaa
MMP-13	gacagtggagggtggccttac	ggctctcaaaagggcgactga
MMP-14	cagttcgccgactaagcaga	gagctcacttacttcggggc
TNF- α	tgtccctttcactcactggc	catcttttgggggagtgctt

Col 1a1	acgtcctggtgaagttggtc	caggggaagcctctttctcct
Col 1a2	ctggtgaaacctgcatccag	ctgggcgcggctgtatga
Col 3a1	ggtggttttcagttcagctatgg	ctggaaagaagtctgaggaatg
MCP-1	gcaccagcaccagccaactct	tggatgctccagccggcaact
FSP-1	ggggcgcctatcgccaatga	ggcaagcctcgcgaccattct
IFN- γ	gcaaacttcggttgccat	cgacgcatgtcaatgctcag
IL-6	tccagttgccttcttgggac	agtctcctctccggacttgt
Gap-DH	ttcattgacctcaactacat	gagggggccatccacagtctt

3.1.8 Software

Software	Hersteller
Bio 1D	Vilber Lourmat
CellQuest Pro	BD Bioscience, Heidelberg
Graphpad Prism 5	Graphpad Software, San Diego
LightCycler Software version 3.5	Roche, Mannheim
MetaMorph 4.6.9r	Universal Imaging (Visitron System, Puchheim)
MS Office 2007	Microsoft

3.2 Versuchstiere

Für die geplanten *in vivo* Versuche wurden CD73-defiziente Mäuse gezüchtet, die zuvor am National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases generiert worden waren. Zur Generierung wurde das Protokoll für Gene-Trapping verwendet. Bei dieser Methode wurde ein Targeting-Vektor, der die Exons zwei und drei, der katalytisch aktiven Domäne, des CD73-Gens ersetzen sollte, generiert und in 129SvEv Stammzellen transfiziert. Stammzellklone mit integriertem Vektor wurden in C57BL/6J Blastozysten injiziert und diese in scheinträchtigen Ammentieren ausgetragen. Chimäre Mäuse wurden mit C57BL/6J Mäusen gekreuzt, um heterozygote Nachkommen zu erhalten. Homozygote Tiere wurden durch Kreuzung heterozygoter Mäuse gezüchtet. Als Versuchstiere wurden ausschließlich Wurfgeschwister im Alter von 8-10 Wochen verwendet.

Die Tierzucht erfolgte an der Universität Regensburg. Die Tierhaltung (Temperatur: $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, Luftfeuchtigkeit: $55 \pm 5\%$, Hell-Dunkel-Intervall: 12 h, Futter und Wasser ad libitum) und die Durchführung der Experimente erfolgten gemäß den Empfehlungen der FELASA. Alle operativen Eingriffe wurden mit herkömmlichen chirurgischen Instrumenten unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

3.3 Methoden

3.3.1 Unilaterale Ureterobstruktion

Zur Induktion einer renalen Fibrose wurde das Modell der unilateralen Ureterobstruktion (UUO) gewählt. Zunächst wurden je acht CD73-KO und WT Mäuse, im Alter von 8-10 Wochen, durch eine Isofluran-Inhalationsnarkose betäubt. Daraufhin wurde der Peritonealraum eröffnet und der linke Ureter freipräpariert. Der jeweils linke Ureter wurde mit steriler Seide zweifach ligiert. Anschließend wurde die abdominale Wand in zwei separaten Schritten verschlossen, wobei die Bauchmuskulatur mit Einzelknopfnähten versehen wurde und die äußeren Hautschichten geklammert wurden. Die Eingriffe verliefen ohne Komplikationen, wie Wund- oder systemische Infektionen. Innerhalb der folgenden sieben Tage entwickelte sich in der ligierten Niere eine

Hydronephrose, die sich in einer Fibrose manifestierte. Nach dieser siebentägigen Periode, wurden die Tiere erneut über eine Isofluran-Narkose betäubt und durch eine zervikale Dislokation getötet. Anschließend erfolgte die Entnahme der fibrotischen und contralateralen Nieren.

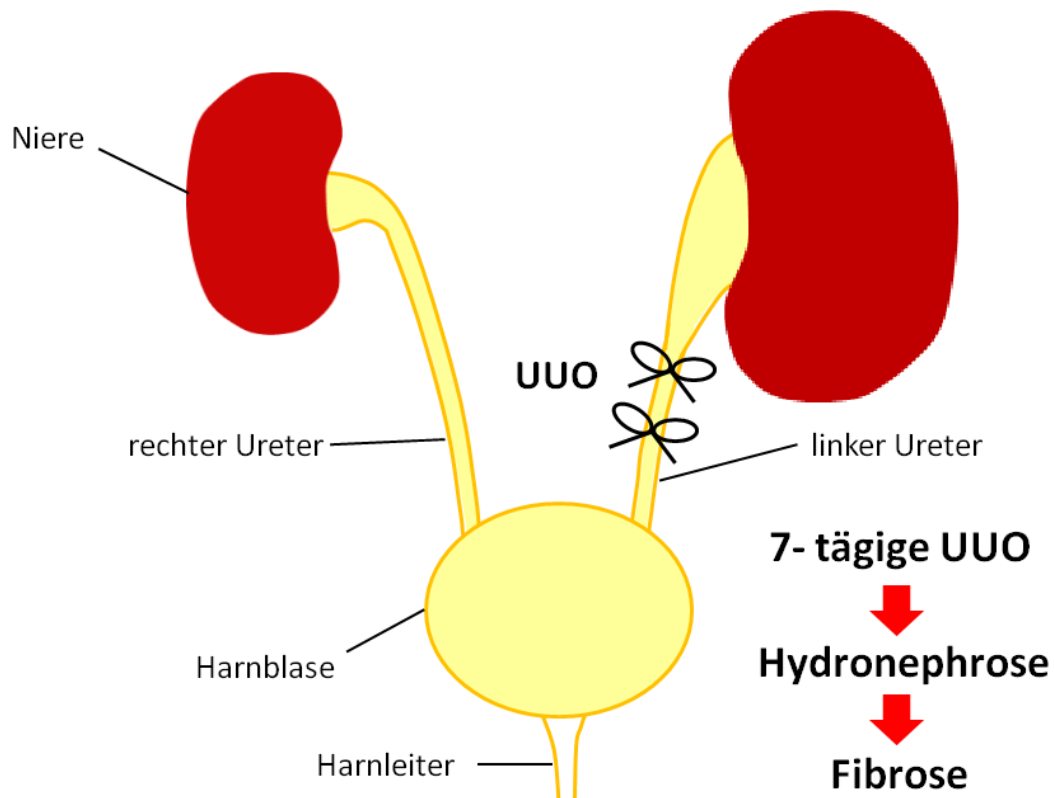


Abb. 8: Schema zur Induktion einer renalen Fibrose durch UUO

3.3.2 Quantitative Bestimmung der mRNA Expression fibrotischer Markergene

Zur quantitativen Bestimmung der mRNA Expression fibrotischer Markergene wurde RNA aus Nierengewebe isoliert. Dazu wurden CD73-KO und WT Mäusen, sieben Tage nach UUO, fibrotische und contralaterale Nieren entnommen, in flüssigem N₂ schockgefroren und die Organe anschließend in je 2 ml Trizol mikrodissiziert. Die RNA wurde nach einem Standardextraktionsprotokoll isoliert. Nach Konzentrationsbestimmung wurde die RNA revers transkribiert und die komplementäre DNA (cDNA) für eine quantitative Real-Time-PCR eingesetzt. Diese erfolgte mit Hilfe des Roche Light-Cycler Systems und dem Einsatz

spezifischer Primer (siehe Material). Die Expressionsdaten einzelner fibrotischer Markergene, wurden im Verhältnis zur Gap-DH mRNA Expression normiert.

3.3.3 Quantitative Bestimmung des Proteingehalts ECM Moleküle mittels Western Blot Analyse

Um den Proteingehalt einzelner Moleküle der ECM zu bestimmen, wurden aus CD73-KO und WT Mäusen, sieben Tage nach UUO, fibrotische und contralaterale Nieren entnommen und daraus Gesamtproteine extrahiert. Die Proteinisolation erfolgte durch Homogenisierung der Organe in RIPA-Puffer und anschließender Zentrifugation. Der Überstand wurde bei -80°C gelagert. Die Proteinkonzentration wurde unter Verwendung eines BCA-Assay-Kits (Pierce), mittels eines BSA Standards, bestimmt. Es wurden jeweils 50-100 µg des Gesamtproteinextrakts auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und die Proteine per Elektrophorese nach Proteingröße aufgetrennt. Die Proteine wurden daraufhin durch Nassblotten auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch eine über Nacht Inkubation in 0,5% Magermilch/TBS-Puffer blockiert. Es folgten eine 2h Inkubation des Blots mit spezifischen Antikörpern gegen α SMA bzw. Fibronektin (je 1:500 in TBS) und nachfolgend an einen dreifachen Waschschrift mit TBS-T, eine weitere 2h Inkubation mit spezifischen Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern (1:2000). Nach einem weiteren dreifachen Waschschrift mit TBS-T, wurden anschließend die spezifischen Proteinbanden mit Hilfe einer ECL-Western Blotting-Lösung detektiert und durch Entwicklung auf Röntgenfilm abgebildet. Die Quantifizierung der Proteinmenge wurde unter Verwendung der Software Bio 1D durchgeführt.

3.3.4 Immunhistochemie

Um die Menge an gebildeter ECM im fibrotischen Nierengewebe von CD73-KO und WT Mäusen vergleichen zu können, wurden Gewebeschnitte fibrotischer und contralateraler Nieren aus beiden Genotypen angefertigt. Das Gewebe wurde dabei durch Perfusion der abdominalen Aorta narkotisierter Mäuse, mit 3%iger Paraformaldehyd/PBS-Lösung fixiert. Die anschließend entnommenen Nieren wurden in Paraffin eingebettet und davon 5 µm dicke Gewebeschnitte hergestellt, diese entparaffiniert und in 1% BSA/PBS blockiert. Es folgte eine über Nacht Inkubation mit Antikörpern gegen α SMA bzw. Fibronectin in 10% Horse Serum und 1% BSA/PBS. Nach einem dreifachen Waschschrift wurden die Schnitte für weitere 2h mit entsprechenden Cy2- bzw. TRITC- konjugierten sekundären Antikörpern und einem Dapi-Farbstoff zur Kernfärbung inkubiert. Die Analyse der Proteinfärbungen, wurde mittels eines Axiovert 200M Mikroskops durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten Färbungen ohne primären und nur mit sekundärem Antikörper.

3.3.5 Bestimmung des Gesamtcollagengehalts mittels Sirius

Red/Fast Green Färbung

Um den Gehalt an Gesamtcollagen im Nierengewebe zu bestimmen, wurden paraffinfixierte Nierenschnitte aus CD73-KO und WT Tieren (siehe Immunhistochemie), nach Entparaffinierung, 30min in einer 0,3%igen Sirius Red/Fast Green/Picrinsäure-Lösung gefärbt. Der rote Farbstoff färbte Gesamtcollagenfasern, der grüne Farbstoff färbte alle Restproteinbestandteile im Gewebe an. Zur Quantifizierung wurden die Färbungen mittels eines LSM 5 Exciter, Zeiss, Jena abfotographiert und anschließend der Collagengehalt bzw. der Restproteingehalt, unter Verwendung der Software MetaMorph, bestimmt. Dabei wurde der Collagengehalt pro Nierenschnitt auf den Gehalt an Restprotein normiert.

3.3.6 Messungen der glomerulären Filtrationsrate (GFR) fibrotischer Nieren

Um Aufschluss über die Nierenfunktion nach Induktion einer renalen Fibrose zu erhalten, wurden Messungen der glomerulären Filtrationsrate nach einer reversiblen Ureterobstruktion (RUUO) durchgeführt. Zunächst wurde bei CD73-KO und WT Mäusen, parallel zur unilateralen Ureterobstruktion, der linke Ureter ligiert. Im Unterschied zur UUO wurde dieser jedoch mit Hilfe einer Gefäßklemme abgebunden. Um zu verhindern, dass das Gewebe an der ligierten Stelle in einem Maße beschädigt wird, welches eine Regeneration und somit die Durchgängigkeit des Ureters nach Entfernen der Klemme beeinträchtigen würde, wurde die Gefäßklemme alle zwei Tage repositioniert. Nach einer Dauer von insgesamt sechs Tagen, wurde die Ligatur entfernt. Um die GFR der fibrotischen Niere zu messen, wurde an Tag sieben nach der Obstruktion des linken Ureters, der contralaterale rechte Ureter durch eine klassische UUO abgebunden. Am darauffolgenden Tag wurden GFR-Messungen durchgeführt. Diese erfolgten an wachen Mäusen mittels der FITC-Sinistrin-Clearance, nach retroorbitaler Injektion einer 5%igen FITC-Sinistrin-Lösung. Die Menge an injiziertem Sinistrin bezog sich dabei auf das Körpergewicht ($3,74 \mu\text{l/g KGW}$). Bevor die Sinistrinlösung injiziert wurde, wurden die Tiere durch eine Isofluraninhalation narkotisiert. Anschließend erfolgten Blutentnahmen aus den lateralen Schwanzvenen bei Zeitpunkten von 3, 7, 10, 15, 35, 55 und 75 min nach Injektion. Die Blutproben wurden in heparinisierten $5 \mu\text{l}$ -Kapillaren gesammelt und nach Versuchsende abzentrifugiert. Das gewonnene Plasma wurde 1:10 mit HEPES-Puffer verdünnt und anschließend die Fluoreszenz in einem Nanodrop Fluoreszenzspektrometer bestimmt. Zur Konzentrationsbestimmung des Sinistrins im Plasma wurde zusätzlich die Fluoreszenz einer Standardreihe, unter Verwendung der 5%igen FITC-Sinistrin-Lösung, in Verdünnungen von 1:100, 1:500, 1:1000, sowie 1:2000 vermessen. Zur Auswertung der GFR wurde ein zwei-Kompartiment-Modell zur Bestimmung der Inulin-Kinetik berechnet, welches parallel zur Sinistrin-Clearance verwendet wurde (Qi et al., 2004).

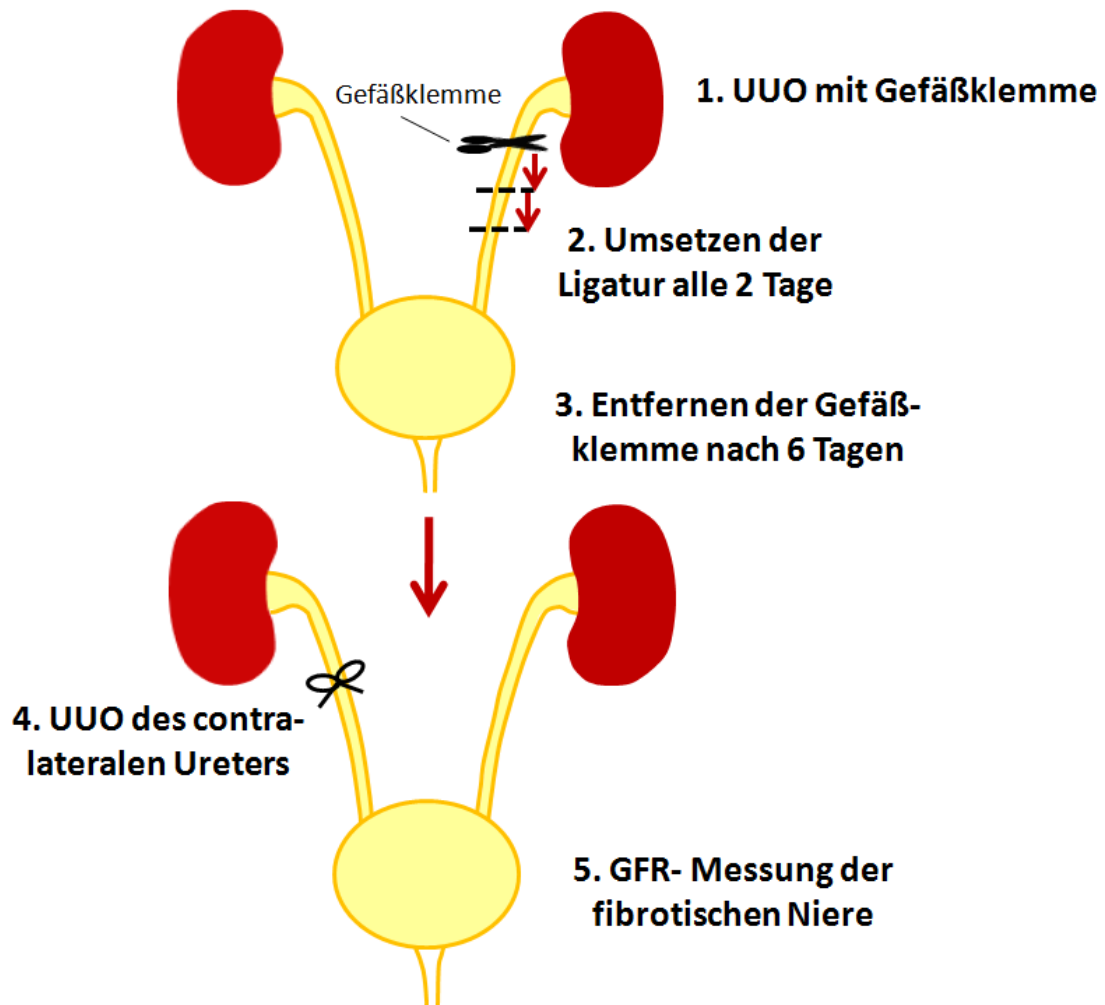


Abb. 9: Versuchsschema der reversiblen UUO (RUUO)

3.3.7 Präparation von Nierenzellen für die FACS-Analyse

Sieben Tage nach UUO, wurden fibrotische und kontralaterale Nieren aus CD73-WT und KO Mäusen entnommen und das Gewebe für eine FACS-Analyse fibrotischer Zellen präpariert. Dazu wurde das Gewebe zunächst zerkleinert und in 5ml Hank's Puffer (HBSS) mit 1mg/ml Collagenase I für 30min bei 37°C inkubiert. Um eine Einzelzellsuspension herzustellen, wurde das verdaute Gewebe durch ein Nygonsieb (70 µm) gedrückt, mit je 5ml kaltem HBSS gewaschen und nach Zentrifugation erneut durch ein Nygonsieb (40 µm) gefiltert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt, wurde das entstandene Zellpellet in PBS aufgenommen und die Zellanzahl mittels einer FACS-Analyse (**F**luorescence **A**ctivated **C**ell **S**orting) ermittelt.

3.3.8 Antikörperfärbung von Oberflächenproteinen spezifischer fibrotischer Zellen

Zur Bestimmung der Zellzahl spezifischer fibrotischer Zellen im Nierengewebe, wurden spezifische Oberflächenantigene gefärbt und die gefärbten Zellen anschließend per Durchflusszytometrie quantifiziert. Die aufgereinigten Zellsuspensionen wurden mit spezifischen Antikörpern (siehe Antikörper) für 20min, bei 4°C, unter Lichtausschluss inkubiert, mit PBS gewaschen und abzentrifugiert. Die gefärbten Zellen wurden erneut in PBS aufgenommen. Auf die primäre Färbung mit biotinylierten Antikörpern folgte eine sekundäre Färbung mit Fluorochrom-gekoppeltem Streptavidin, erneutem Waschen in PBS und Zentrifugation. Das Sediment wurde in PBS aufgenommen und für die FACS-Analyse eingesetzt.

3.3.9 Färbung von Fibrozyten für die FACS-Analyse

Zur Bestimmung der Fibrozytenzahl im Nierengewebe, wurden die isolierten Zellsuspensionen in FACS-Röhrchen aufgeteilt und für 20 min bei 4°C im Dunkeln, zusammen mit anti-CD45-FITC Antikörpern inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweifach mit PBS gewaschen, 20 min mit 150 µl CytoFix/CytoPerm, bei 4°C, im Dunkeln behandelt und mit einer 0,1%igen Saponinlösung gespült. Die Suspensionen wurden halbiert, ein Teil mit einem biotinylierten anti-Collagen I-Antikörper und der zweite Teil mit einer Biotin-gekoppelten Isotyp-Kaninchen IgG Kontrolle, jeweils verdünnt in 0,1% Saponin, für 45 min, bei 4°C, im Dunkeln gefärbt. Nach weiteren Waschschritten in 0,1% Saponin, einer 30minütigen Behandlung mit Streptavidin-APC, bei 4°C und einem weiteren Waschschriff, wurden die Zellen zur Analyse im Durchflusszytometer in PBS aufgenommen.

3.3.10 Durchflusszytometrie

Um Zellzahlen spezifischer Zellspezies zu bestimmen, wurden durchflusszytometrische Messungen mittels der sog. FACS-Analyse durchgeführt. Bei dieser Methode werden Zellen in Suspension mit einer Trägerflüssigkeit gebracht, in der sie einzeln aufgereiht vorbei an einem eng gebündelten Laserstrahl durch das Gerät fließen. Dabei werden von den vorher angefärbten Zellen Streulicht- und Fluoreszenzsignale erzeugt, welche über verschiedene Linsen, Spiegel und Filtersysteme auf Photodetektoren gelenkt und hier verstärkt werden. Dabei unterscheidet man den Forward und Sideward Scatter. Während das über den Forward Scatter detektierte Vorwärtsstreulicht Aufschluss über die Zellgröße gibt, wird über den Sideward Scatter die Granularität der Zellen erfasst.

Die Ergebnisse darüber werden im sog. Dotplot Diagramm als distinkte Zellpopulationen dargestellt. Diese Populationen können über das Setzen einzelner Gates voneinander abgegrenzt werden. Fluoreszenzmarkierte Zellen absorbieren, nach Anregung durch Laser mit einer spezifischen Wellenlänge, Energie einer höheren Wellenlänge. Diese wird durch Detektoren in ein elektrisches Signal umgewandelt, welches proportional zur Anzahl der markierten Zellepitope ist. Durch den Einsatz verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe, können unterschiedliche Epitope derselben Zelle gleichzeitig markiert werden. Im hier verwendeten FACSCalibur Durchflusszytometer, konnten bis zu sechs Parameter für eine Zelle gemessen werden. Durch die Auftragung einer Zweifarbenanalyse gegeneinander, ließen sich somit verschiedene Subpopulationen identifizieren.

3.3.11 Magnetische Zellseparation

Für die folgenden Zellkulturversuche wurden CD4⁺ T-Lymphozyten und CD11b⁺ Monozyten aus Milzen von CD73-KO und WT Mäusen isoliert. Dafür wurde die Methode der Magnetischen Zellseparation (MACS = Magnetic Cell Sorting) verwendet. Hierbei werden zunächst magnetische Mikropartikel (Microbeads) an zellspezifische Oberflächenproteine gebunden. Die Zellsuspension wird anschließend durch spezielle Trennsäulen geführt, in denen eine magnetische Matrix sitzt, die die markierten Zellen von der Gesamtzellsuspension abtrennt.

Zur Isolation von CD4⁺ T-Lymphozyten bzw. CD11b⁺ Monozyten, wurden Suspensionen aus Mausmilzen von CD73-KO und WT Tieren mit MACS-Puffer versetzt. Um T-Lymphozyten zu extrahieren, wurde die Suspension mit anti-CD4 Microbeads, für 15min, bei 4°C inkubiert. Zellextrakte, aus denen Monozyten gewonnen werden sollten, wurden zuerst für 20 min mit anti-CD16/32-PE, anti-CD11b-PE, anti-CD115-PE oder anti-Gr1-APC in MACS-Puffer bei 4°C gefärbt, bevor sie nach einem Waschschrift mit MACS-Puffer für 15 min, bei 4°C mit anti-PE oder anti-APC-Microbeads beladen wurden.

Nach den Bindungsschritten, wurden sowohl T-Lymphozyten als auch Monozytensuspensionen mit MACS-Puffer gewaschen und wie beschrieben über MS-Säulen, das einem starken Magnetfeld ausgesetzt wurde, an die Säulenmatrix gebunden. Nach Entfernen des Magnetfelds, wurden die gebundenen Zellen durch Waschschriffe mit MACS-Puffer eluiert. Das Eluat wurde erneut auf eine MS-Säule aufgetragen und die beschriebenen Schritte wiederholt, um die Reinheit zu verbessern. Um die Zellen auf Verunreinigungen hin zu testen, wurden diese in einer FACS-Analyse untersucht. Dabei betrug die Reinheit der T-Lymphozyten durchschnittlich 90-95%, die der Monozyten zwischen 70 und 80%.

3.3.12 Differenzierung von Monozyten zu Fibrozyten durch Co-Inkubation mit CD4⁺ T-Lymphozyten

Zur Bestimmung der Zellzahl an CD11b⁺ Monozyten, die sich in Anwesenheit von aktivierten CD4⁺ T-Lymphozyten zu Collagen I positiven Fibrozyten differenzieren, wurden *in vitro* Zellkulturansätze untersucht. Zunächst wurden kultivierte CD4⁺ T-Zellen durch Zugabe von anti-CD3-Antikörpern, zusammen mit CD19⁺ B-Zellen inkubiert. Durch diese Co-Inkubation, wurden CD4⁺ T-Lymphozyten zur Zytokinproduktion aktiviert, welche ins Zellkulturmedium abgegeben wurden. Die mit Zytokinen angereicherten Überstände wurden 72h nach Inkubationsbeginn abgenommen und bei -20°C gelagert. Um Monozyten zur Ausdifferenzierung zu Fibrozyten anzuregen, wurden diese zusammen mit 80% des gewonnenen T-Zell-Überstands in frischem Medium in 96-Wellplatten inkubiert. Nach sieben Tagen, wurde die Zellzahl an ausdifferenzierten spindelförmigen Fibrozyten bestimmt. Dafür wurden je drei Fotos je Well, bei

einer 200x Vergrößerung, im Durchlichtmikroskop angefertigt und ausgewertet. Als Kontrolle dienten unstimulierte Monozytenkulturen.

3.3.13 Nachweis von Collagen I mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Die in Zellkultur ausdifferenzierten Fibrozyten sind durch die Produktion von Collagen I charakterisiert. Dieses wird von den Zellen an den extrazellulären Raum abgegeben, wo es sich an die Zellkulturplatte anlagert. Der Gehalt an sezerniertem Collagen I wurde mittels eines ELISA über Collagen I spezifische Antikörper gemessen. Dazu wurden zunächst die kultivierten Fibrozyten, durch Zugabe von 1,5 mM EDTA für 15 min, bei 37°C, von der Zellkulturplatte entfernt. Nachfolgend wurde die Platte mit PBS gewaschen und freie Bindungsstellen mit 4% BSA/PBS, bei 4°C, über Nacht blockiert. Anschließend an einen dreifachen Waschschrift mit ELISA-Waschpuffer, wurde die Zellkulturplatte mit biotinylierten Collagen I Antikörpern für 5h inkubiert und daraufhin erneut dreimal gewaschen. Zur Detektion des Collagens wurde HRP-gekoppeltes Streptavidin (1:1000) zugefügt, welches die oxydative Farbreaktion des Substrats ABTS katalysiert. Zur Auswertung des Collagengehalts, wurde die optische Dichte mittels einem ELISA-Reader nach 60 min, bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 490 nm bestimmt.

3.3.14 Transplantation von hämatopoetischen Knochenmarksstammzellen nach letaler Bestrahlung

Zur Generierung von Mäusen die eine partielle CD73 Expression oder Deletion in hämatopoetischen Zellen tragen, wurden CD73-WT und KO Mäuse zunächst einer letalen Gammastrahlung von 9,5 Gy, für 10min ausgesetzt. Diese Bestrahlung induzierte einen Gewebeschaden des Knochenmarks, bei dem durch DNA-Doppelstrangbrüche alle hämatopoetischen Stammzellen absterben. Der Strahlungsschaden wird als letal bezeichnet, da die Tiere ohne Retransplantation von hämatopoetischen Stammzellen innerhalb von sieben bis vierzehn Tagen sterben würden. Nach einer Erholungszeit von vier Stunden wurden den Tieren jeweils 4×10^6 Knochenmarksstammzellen eines bestimmten CD73-Genotyps, über eine Injektion in die Schwanzvene transferiert. Die

Knochenmarks-stammzellen wurden durch das Ausspülen des Oberschenkelknochens von CD73-WT und KO Donormäusen gewonnen. Die Versuchstiere wurden zu diesem Transplantationsversuch in vier verschiedene Gruppen aufgeteilt (siehe Abb.): CD73-WT/WT-hSZ, CD73-WT/KO-hSZ, CD73-KO/KO-hSZ, CD73-KO/WT-hSZ.

Nach einer Rekonstitutionsperiode von acht Wochen wurde den Tieren eine renale Fibrose durch UUO induziert. Sieben Tage nach UUO wurden die Tiere unter Narkose getötet und die Nieren zur weiteren Untersuchung entnommen. In den Organen wurde anschließend der Grad an renaler Fibrose, durch die Ermittlung der Expression fibrotischer Marker mittels qRT-PCR und Proteinfärbungen, ermittelt.

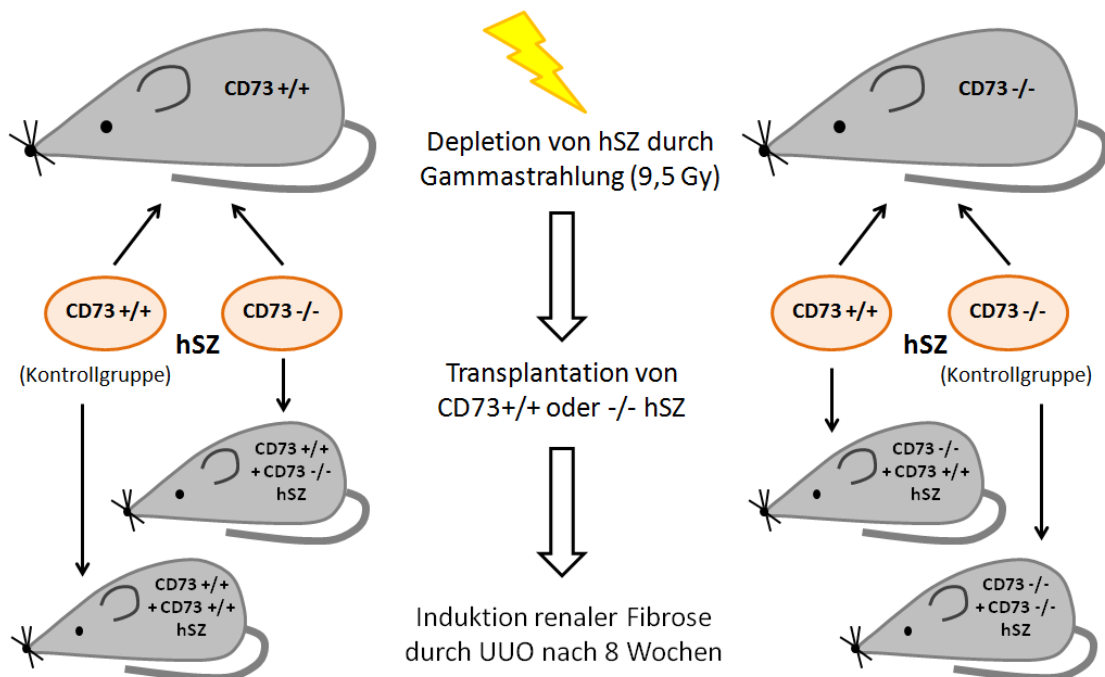


Abb. 10: Schema zum Versuchsablauf bzgl. der Knochenmarkszelltransplantation

3.3.14 Statistik

Die Auswertung aller Daten und die Erstellung von Graphen erfolgte mittels der Software Microsoft Excel 2007 und GraphPad Prism 5. Dabei wurden die Werte im Vergleich zweier Gruppen mit dem Student-t-Test bzw. Signifikanzen mehrerer Gruppen durch eine Varianzanalyse (ANOVA) und die Durchführung eines Bonferroni Tests bestimmt. Als signifikant unterschiedlich wurden dabei p-Werte $\leq 0,05$ betrachtet.

Dabei gilt:

* $p \leq 0,05$

** $p \leq 0,01$

*** $p \leq 0,001$

ns = nicht signifikant

4. Ergebnisse

4.1 CD73- Expression in der fibrotischen Niere

Zur *in vivo* Untersuchung der Nierenfibrose wurde das Modell der unilateralen Ureter-Obstruktion (UUO) gewählt. Um zu überprüfen, ob die CD73-Expression während der Entwicklung einer renalen Fibrose reguliert wird, wurden zunächst die CD73 mRNA- und Proteinlevel im Nierengewebe bestimmt. Sowohl der CD73-mRNA als auch der CD73-Proteingehalt verdoppelten sich dabei in der fibrotischen Niere von WT-Mäusen im Vergleich zur contralateralen Kontrollniere ($205 \pm 56\%$ des mRNA-Levels in Kontrollnieren, $p=0,01$, $n=7$ bzw. $196 \pm 35\%$ des Proteinlevels in Kontrollnieren) (Abb.12)

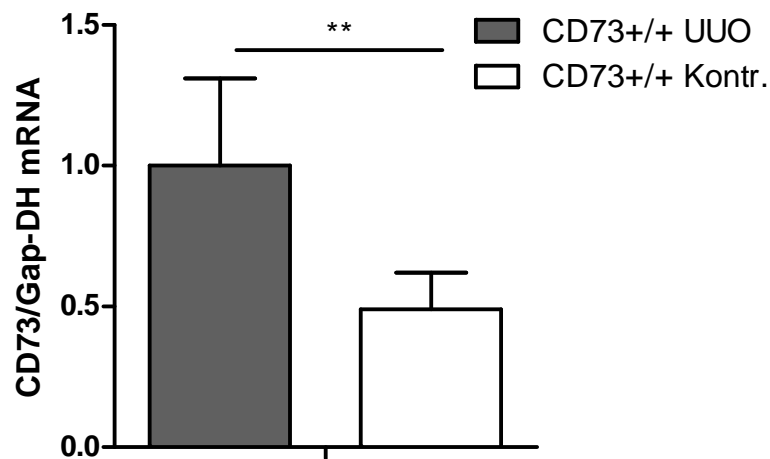


Abb. 11: CD73 mRNA-Gehalt in fibrotischen und contralateralen Nieren von WT Mäusen 7 Tage nach UUO

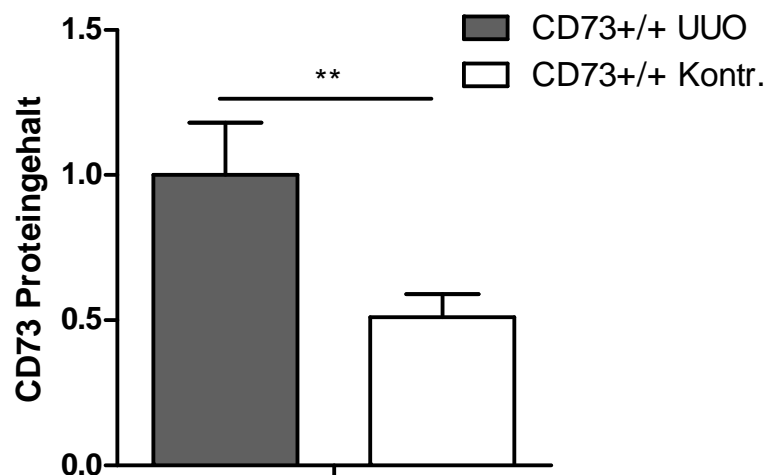
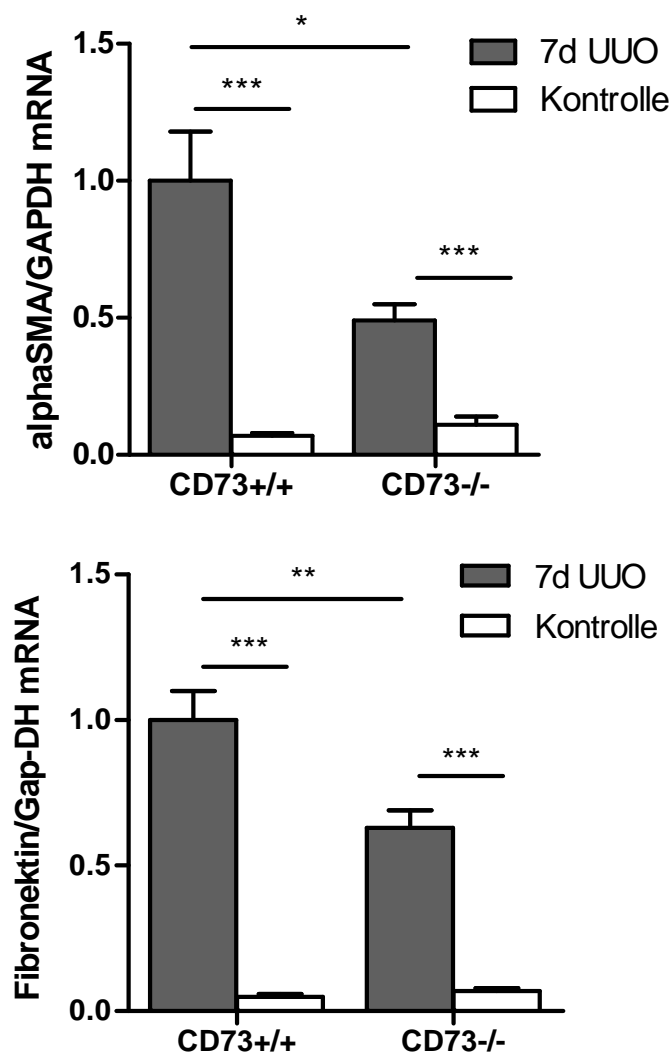


Abb. 12: CD73 Proteingehalt in fibrotischen und contralateralen Nieren von WT Mäusen 7 Tage nach UUO

4.2 mRNA Expressionen fibrotischer Markergene

Um eine mögliche Auswirkung von CD73 auf die Entwicklung der renalen Fibrose im UUO-Modell zu untersuchen, wurden CD73-KO Mäuse mit WT Mäusen verglichen. Zur Bestimmung des renalen Fibrosegrads wurden die mRNA-Expressionsniveaus verschiedener fibrotischer Markergene quantifiziert. Hierbei waren alle gemessenen mRNA Expressionen sowohl in CD73-KO als auch in WT Nieren im Vergleich zu den Kontrollen induziert. Jedoch unterschieden sich fibrotische CD73-KO und WT Nieren im Bezug auf die mRNA Expression verschiedener extrazellulärer Matrix-Proteine (ECM). Dabei entsprachen die α -smooth-muscle-actin (α SMA) Level im CD73-KO 49 \pm 7% des WT, die Fibronektin Level 63 \pm 6% des WT und die Level der Collagene Col1a1, 1a2 und 3a1 48 \pm 9, 52 \pm 8 und 43 \pm 7 % des WT (Abb. 13) (n=8, p<0,05).



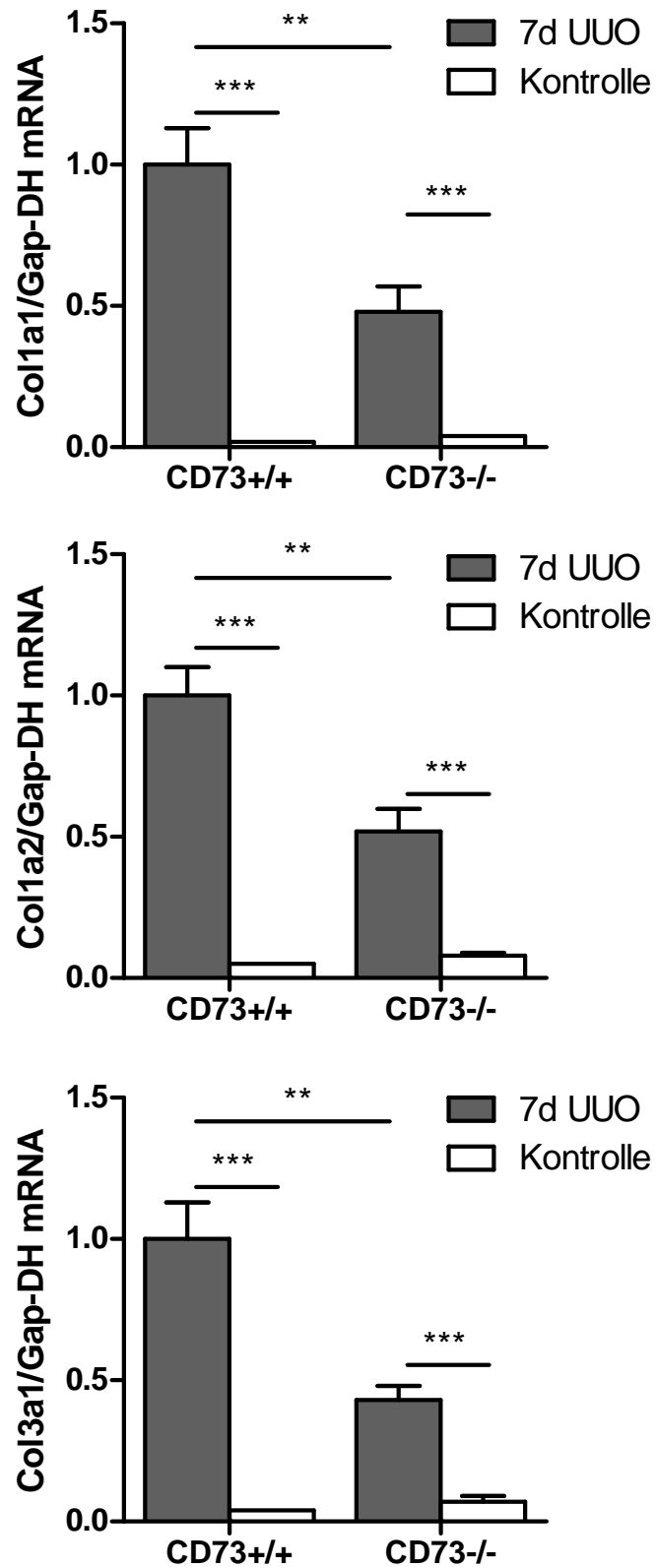
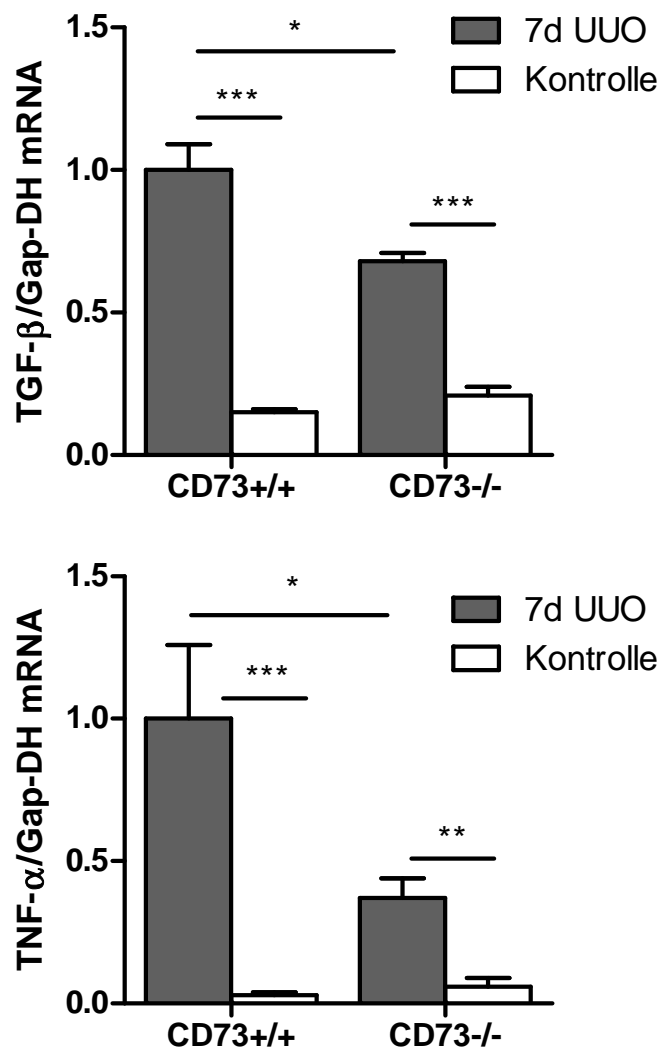
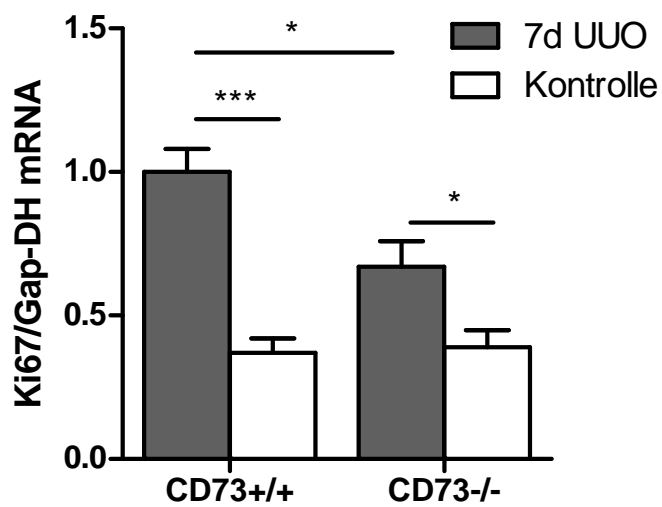
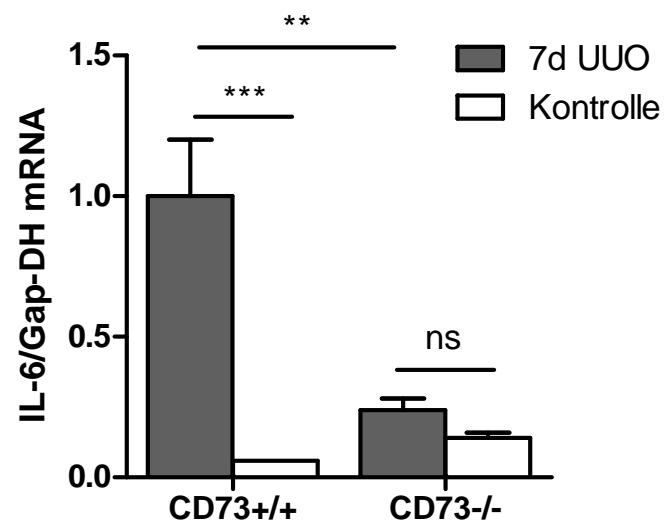
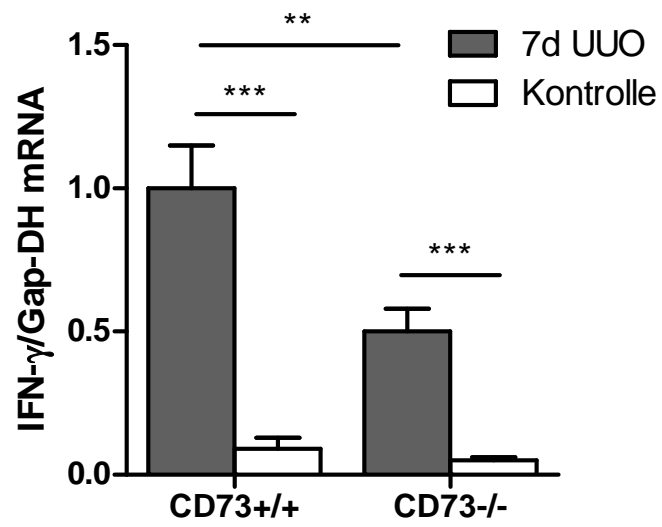
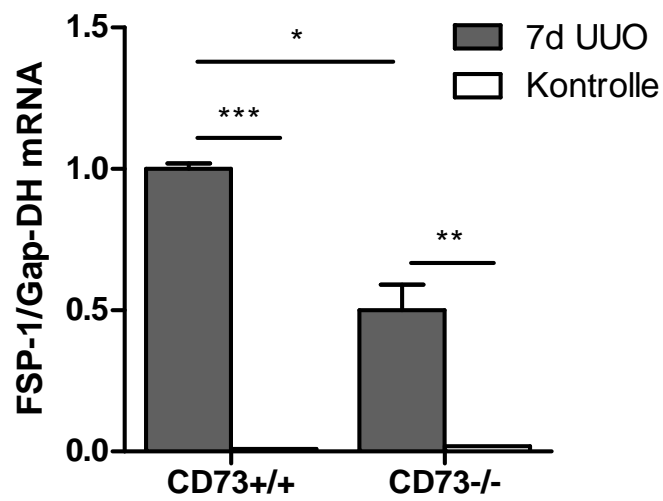
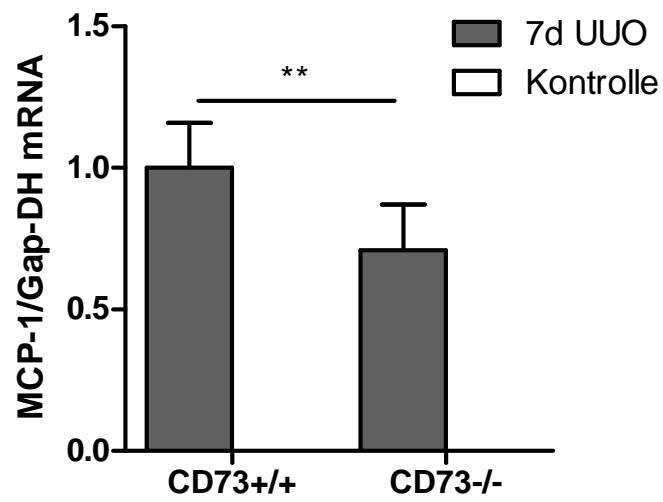
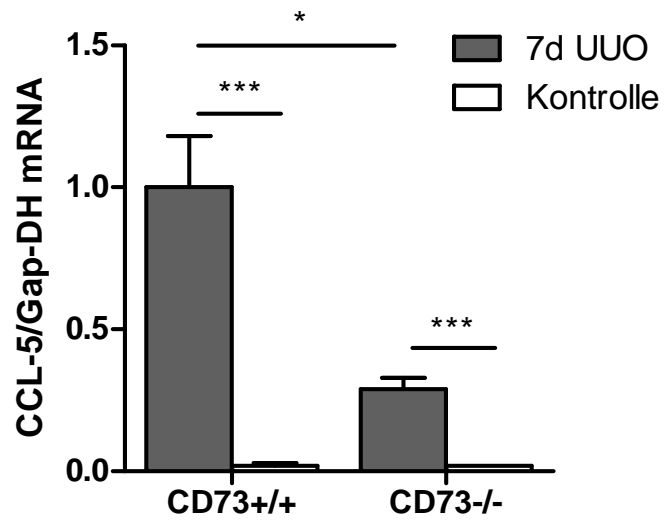


Abb.13: mRNA Expression extrazellulärer-Matrix-Proteine, α SMA, Fibronectin und Collagen 1a1, 1a2 und 3a1 in fibrotischen und contralateralen Kontrollnieren von CD73-KO und WT Mäusen.

Neben den Genexpressionen von ECM-Molekülen, wurden auch die mRNA-Level weiterer für die Entwicklung einer renalen Fibrose wichtiger Zytokine und Fibrosemarker bestimmt. Für den Transforming-Growth-Factor TGF- β ($69 \pm 9\%$ des WT-Levels), den Tumor-Nekrosis-Faktor TNF- α ($37 \pm 7\%$ des WT-Levels), Interferon- γ ($50 \pm 8\%$ des WT-Levels), Interleukin-6 ($25 \pm 5\%$ des WT-Levels), das Zelldifferenzierungsantigen Ki67 ($67 \pm 10\%$ des WT-Levels), das Chemokin CCL-5/RANTES ($29 \pm 5\%$ des WT-Levels), das Monozyten-chemotaktische Protein MCP-1 ($71 \pm 16\%$ des WT-Levels), das Fibroblasten-spezifische Protein FSP-1 ($50 \pm 9\%$ des WT-Levels), sowie für die Matrix-Metallo-Proteinasen MMP-2 ($53 \pm 10\%$ des WT-Levels), MMP-13 ($29 \pm 7\%$ des WT-Levels) und MMP-14 ($58 \pm 11\%$ des WT-Levels) wurden signifikant niedrigere Werte in fibrotischen CD73-KO Nieren als in WT-Nieren gemessen (Abb. 14). Die Werte der mRNA-Expressionen in den Kontrollnieren, unterschieden sich nicht im Vergleich von CD73-KO und WT ($n=7$, $p<0,05$).







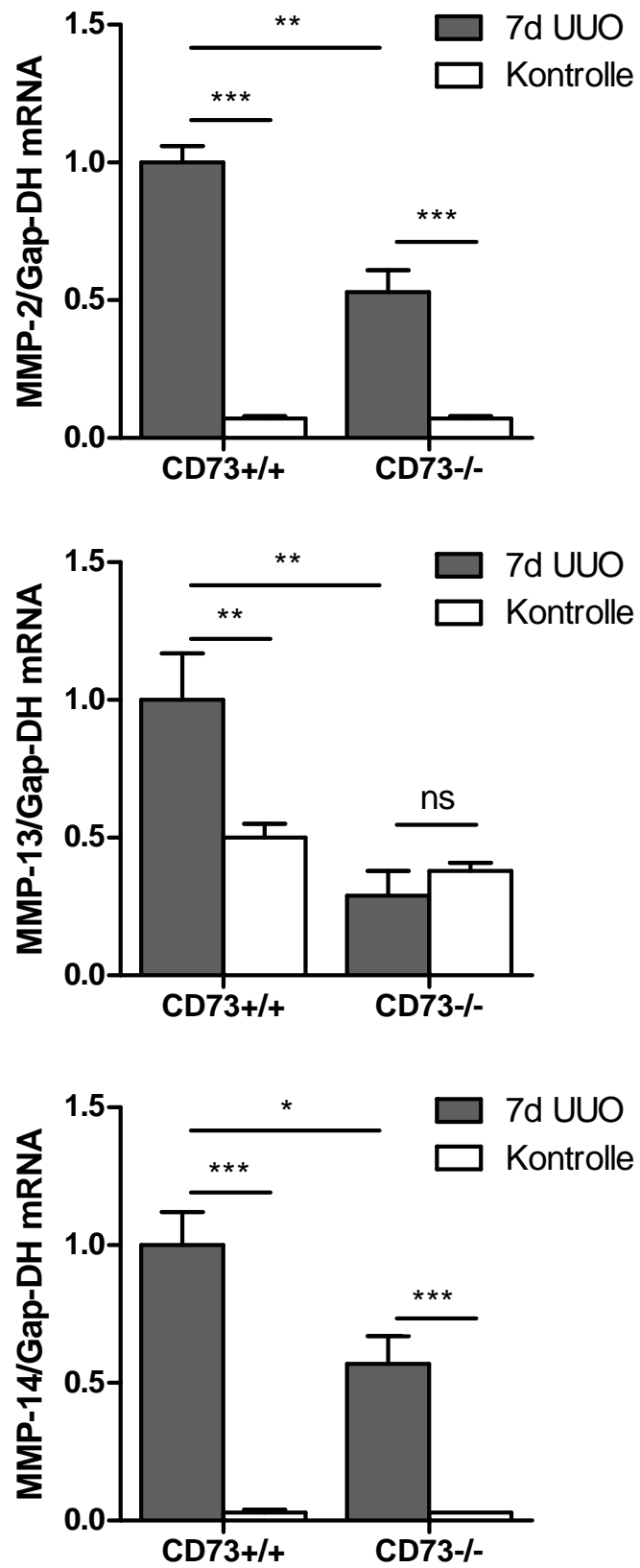
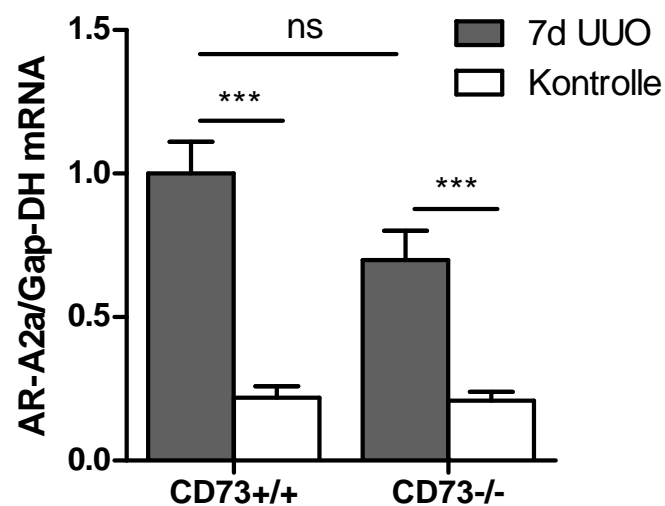
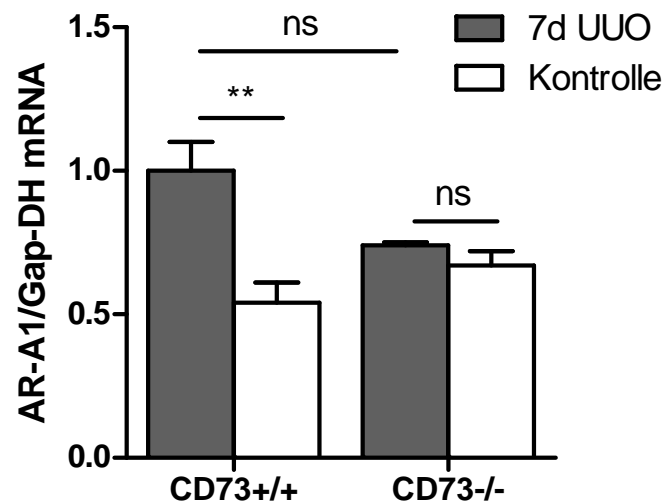


Abb. 14: mRNA Expression fibrotischer Markerproteine und fibrotischer Zytokine in fibrotischen und contralateralen Kontrollnieren von CD73-KO und WT Mäusen.

Weitere mRNA-Expressionen wurden für die Adenosinrezeptorgene AR-A1, AR-A2a, AR-A2b und AR-A3 untersucht. Dabei waren die mRNA Expressionen aller vier Adenosinrezeptoren sowohl im CD73-KO als auch im WT im Vergleich zu den Kontrollnieren induziert ($n=7$, $p<0,05$).

Jedoch zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den mRNA-Level im Vergleich von fibrotischem CD73-KO und WT Nierengewebe (Abb. 15).



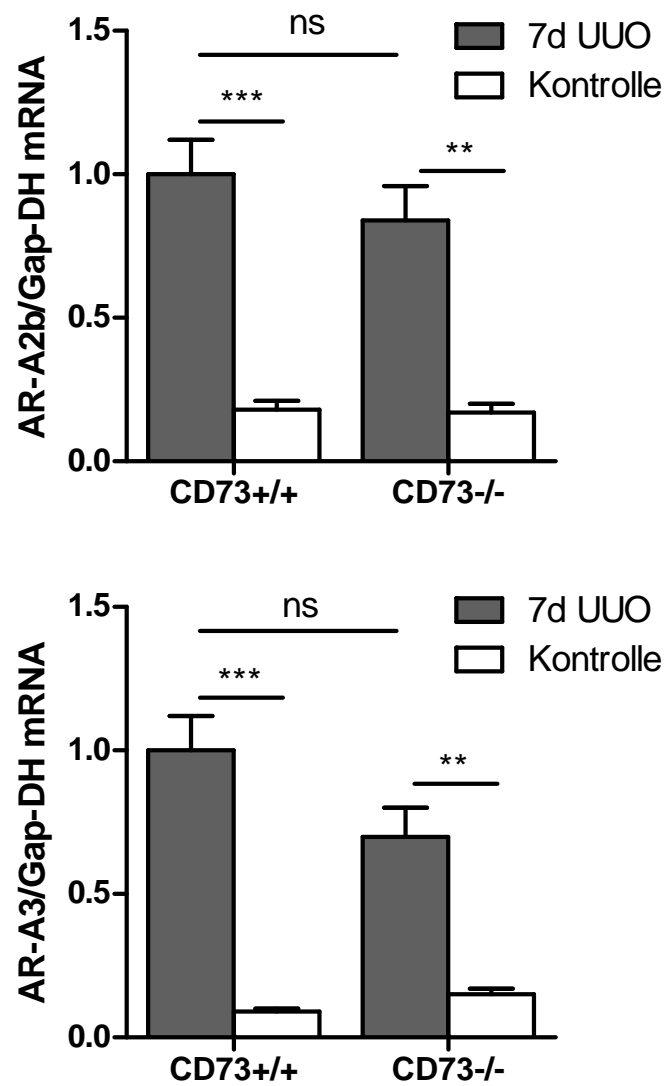


Abb. 15: mRNA Expressionen der Adenosinrezeptoren AR-A1, -A2a, -A2b und -A3 in fibrotischen und contralateralen Kontrollnieren von CD73-KO und WT Mäusen.

mRNA Expressionsdaten der ECM Moleküle und bzgl. fibrotischer Mediatoren waren in fibrotischen WT Nieren gegenüber denen aus CD73-KO Mäusen stärker erhöht. Die Expressionslevel der Adenosinrezeptorgene wiesen zwischen CD73-KO und WT Nieren nach Fibroseinduktion keine Unterschiede auf.

4.3 Proteinexpressionen fibrotischer Marker im Nierengewebe

Um den Gehalt an neugebildeten ECM-Proteinen, die während des fibrotischen Umwandlungsprozesses entstehen bestimmen zu können, wurde die Menge an α SMA, Fibronectin und Gesamtcollagen durch Westernblot Analysen und immunhistochemische (IHC) Färbungen von Nierenschnitten ermittelt. Das Proteinlevel für α SMA und Fibronectin entsprach in fibrotischen CD73-KO-Nieren $16\pm 1\%$ bzw. $23\pm 1\%$ des Gehalts in fibrotischen WT-Nieren (Abb. 16, 17). Eine erhöhte Proteinkonzentration im WT wurde durch IHC-Färbungen in fibrotischem und gesundem Nierengewebe von CD73-KO und WT gegen α SMA und Fibronectin bestätigt. Auch in den IHC-Färbungen konnten geringere Mengen der genannten Proteinfasern im Interstitium von fibrotischen CD73-KO Nierenschnitten bestimmt werden (Abb. 18, 19). Die Kontrollen zeigten in beiden Genotypen ähnliche Proteinexpressionen. α SMA konnte in gesundem Nierengewebe in Blutgefäßen, jedoch nicht im Interstitium gefunden werden.

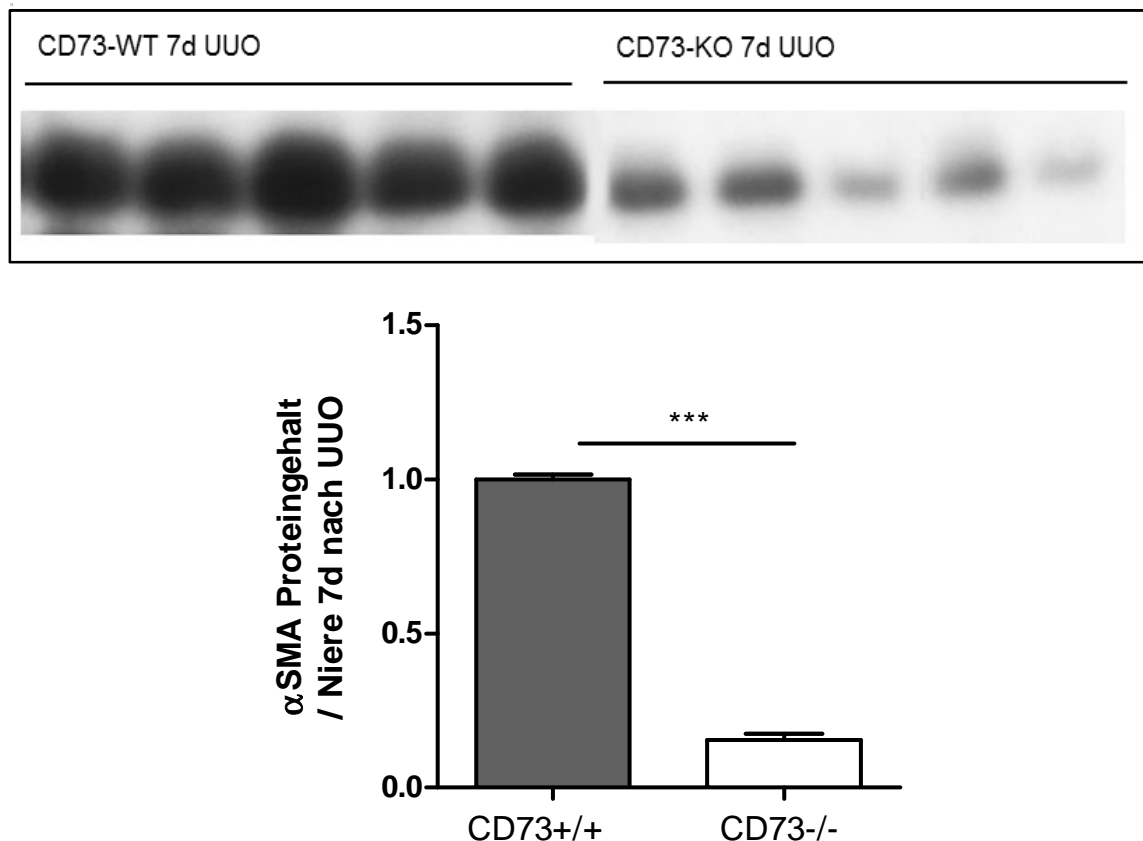


Abb. 16: Westernblot gegen α SMA, detektiert in 30 μ g Gesamtproteinextrakt, isoliert aus CD73-KO und WT Nierengewebe 7 Tage nach UUO (n=5).

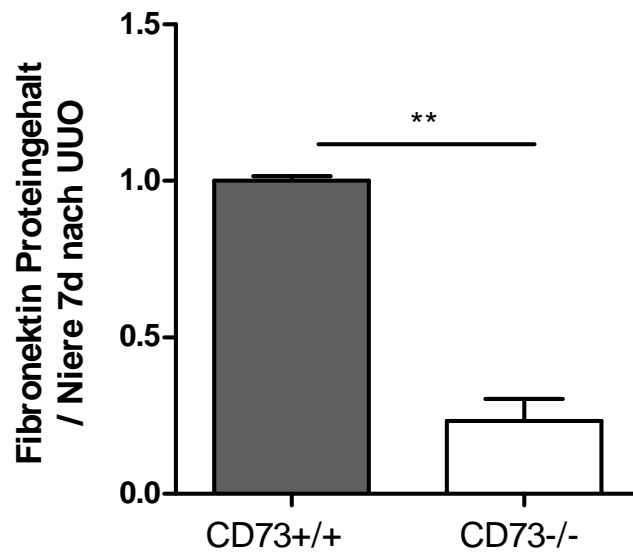
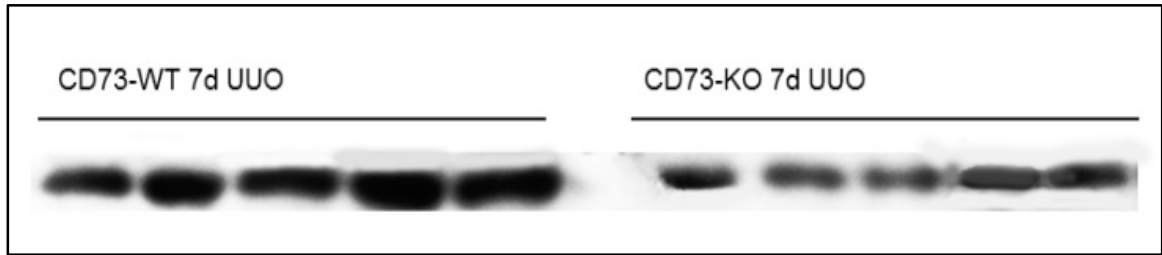


Abb. 17: Westernblot gegen Fibronectin, detektiert in 50 ug Gesamtproteinextrakt, isoliert aus CD73-KO und WT Nierengewebe 7 Tage nach UUO (n=5).

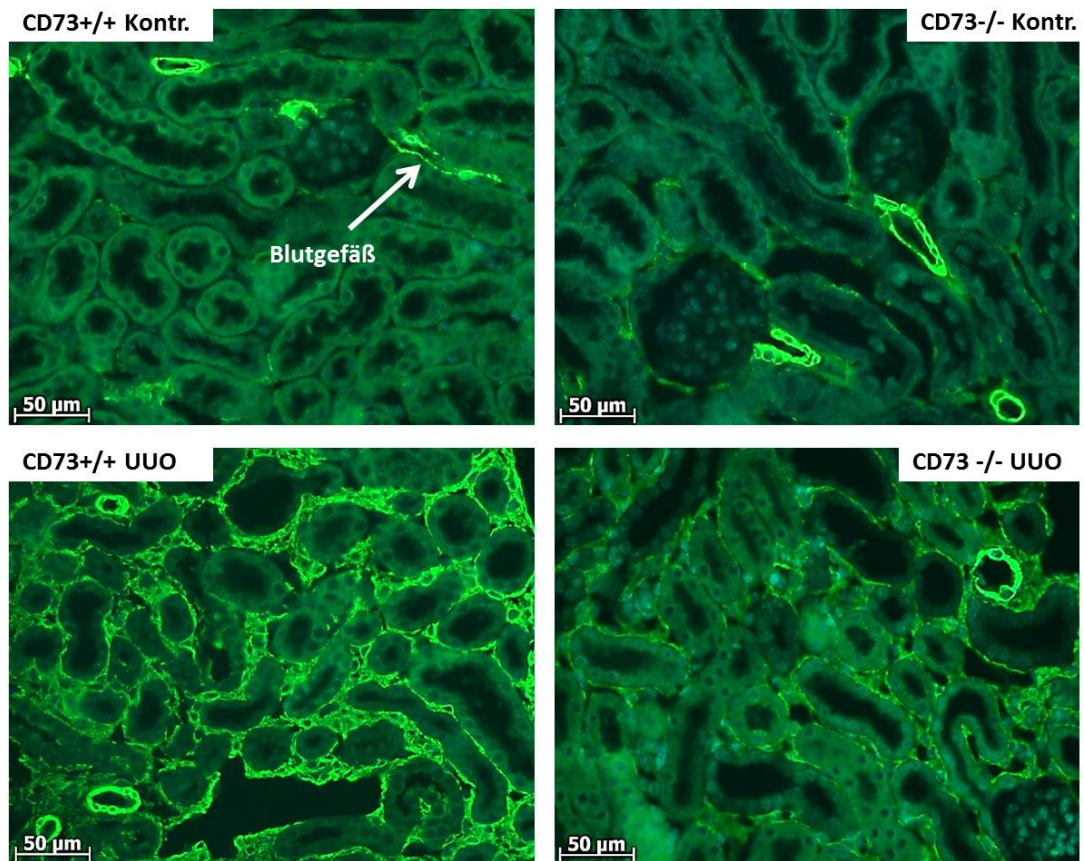


Abb. 18: IHC-Färbungen gegen α SMA in paraffin-fixiertem fibrotischen und Kontrollnierengewebe von CD73-KO und WT Mäusen.

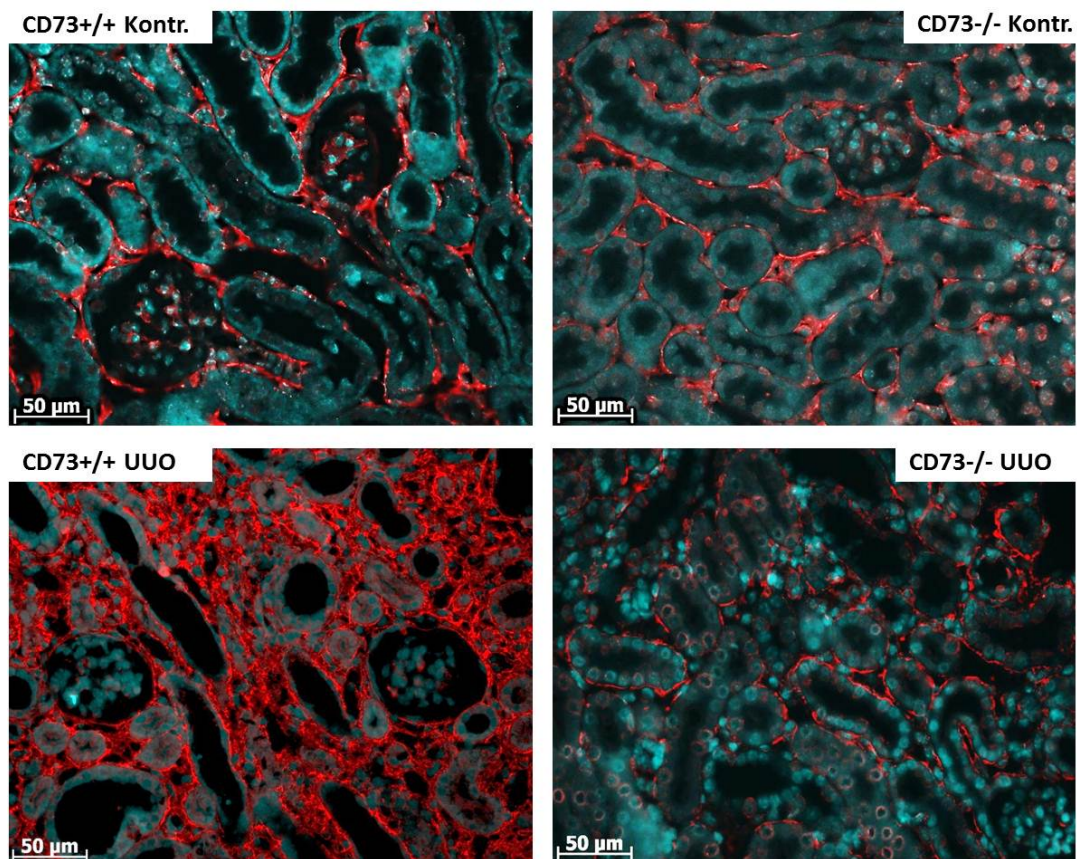


Abb. 19: IHC-Färbungen gegen Fibronectin in paraffin-fixiertem fibrotischen und Kontrollnierengewebe von CD73-KO und WT Mäusen.

Die zur Quantifizierung des Gesamtcollagens im Nierengewebe angefertigten Sirius Red und Fast Green Färbungen zeigten im fibrotischen CD73-KO einen Collagengehalt von $51 \pm 5\%$ des fibrotischen WT ($n=8$, $p<0,05$ für WT vs. KO) (Abb. 20).

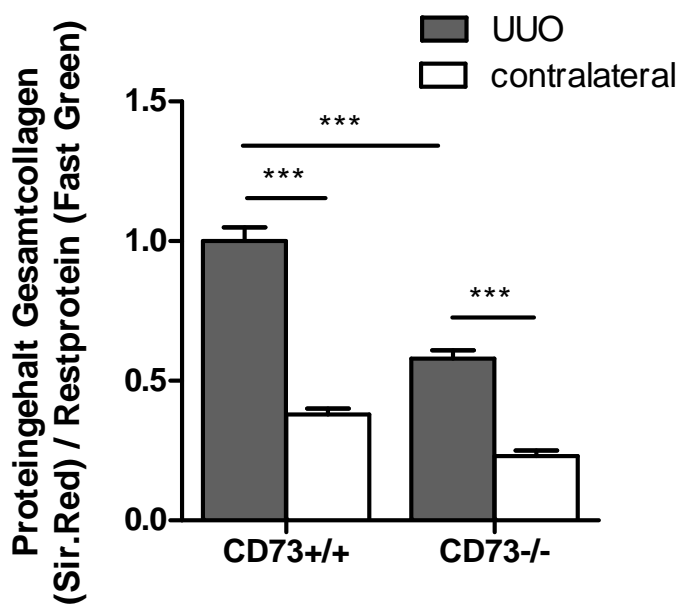
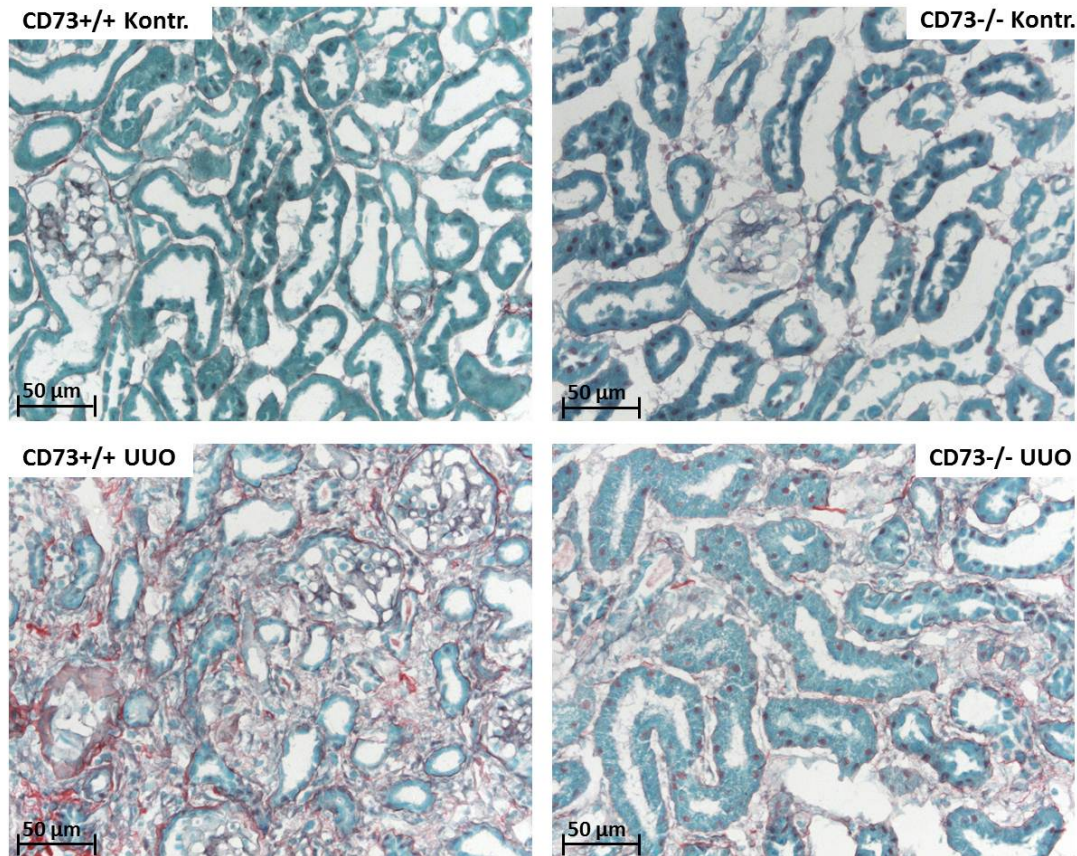


Abb. 20: Sirius Red und Fast Green Färbung von Gesamtcollagenfasern (rot) und Restprotein (grün) in paraffinfixiertem Nierengewebe von CD73-KO und WT Mäusen. Verglichen wurden Kontrollnierenenschnitte mit fibrotischem Nierengewebe 7 Tage nach UUO.

Der gemessene Proteingehalt der ECM-Proteine α SMA, Fibronectin und Collagen war nach Fibroseinduktion in CD73-KO und WT Nieren erhöht. Der Proteingehalt war dabei jedoch für alle getestete ECM-Moleküle im CD73-WT verglichen mit dem KO signifikant erhöht.

4.4 Bestimmung der GFR nach reversibler UUO

Um zu untersuchen, ob der Knockout von CD73 einen Einfluss auf die Nierenfunktion nach UUO, durch eine verringerte Produktion von ECM und somit einer verringerten Einschränkung der Tubuluslumina besitzt, wurden Messungen der glomerulären Filtrationsraten (GFR) durchgeführt.

Die glomeruläre Filtration wurde mit Hilfe der FITC-Sinistrin-Clearance vor und nach reversibler UUO bei CD73-KO und WT Mäusen gemessen. In unbehandelten Tieren unterschieden sich die GFR-Werte nicht zwischen den beiden Genotypen (WT: $295,6 \pm 14,1$ und KO: $285,7 \pm 17,8$ $\mu\text{l}/\text{min}$). Nach Entfernung einer 6-tägigen Ureterligatur, und der Obstruktion des contralateralen Ureters der unbehandelten Niere, wurde die GFR der fibrotischen Niere bei beiden Genotypen bestimmt. Da bei dieser Methode Werte von nur einer Niere gemessen wurden, wurden diese mit 50% der Basiswerte verglichen. Die WT-GFR sank nach Fibroseinduktion von 147,8 (GFR einer Niere) auf $27,2 \pm 4,5$ $\mu\text{l}/\text{min}$. Die GFR der CD73-KO Mäuse verringerte sich von 142,8 (GFR einer Niere) auf $99,0 \pm 17,0$ $\mu\text{l}/\text{min}$. Somit konnte eine Reduktion der GFR in der Fibrose für WT-Tiere auf 10% und für CD73-KO Mäuse auf 33% der Ausgangswerte bestimmt werden ($n=6$, $p<0,05$). Vergleich man dabei die GFR-Daten mit dem Körpergewicht (KGW) der Versuchstiere, so erhielt man in Relation zum KGW ähnliche Ergebnisse (50% Basis-GFR: $552,6 \pm 16,8$ $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$ für WT, $562,7 \pm 12,3$ $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$ für CD73-KO, GFR nach reversibler UUO: $123,1 \pm 13,8$ $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$ für WT und $472,3 \pm 102,9$ $\mu\text{l}/\text{min}/100\text{g}$ für CD73-KO) (Abb. 21).

Folglich wurde die glomeruläre Filtration im CD73-KO nach Fibroseinduktion weniger eingeschränkt als im WT.

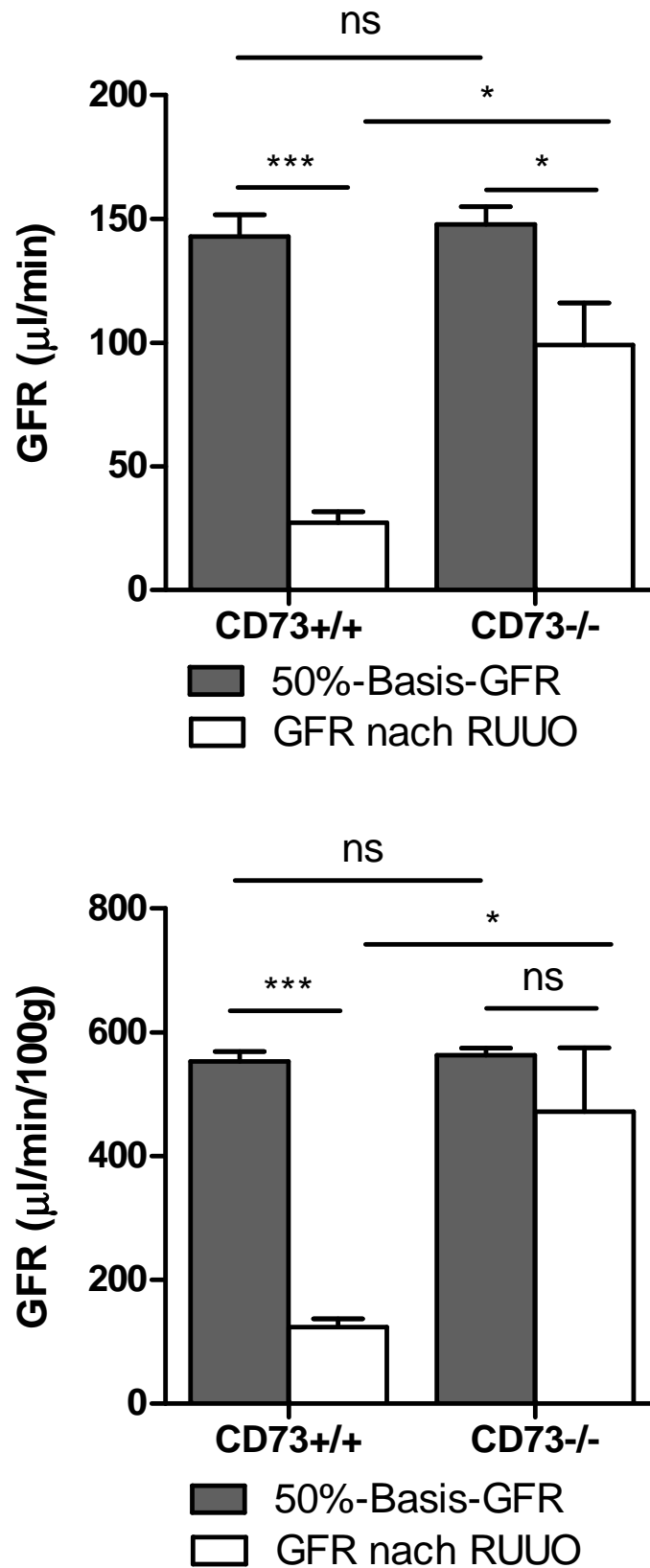


Abb. 21: GFR-Messungen vor und nach reversibler UUO in CD73-KO und WT Mäusen. untere Abb. zeigt GFR-Werte im Bezug auf das Körpergewicht.

4.5 FACS-Analyse fibrotischer Zellen

An der Umwandlung von gesundem hin zu fibrotischem Nierengewebe sind verschiedene Zelltypen beteiligt. Um zu überprüfen, ob es Unterschiede in der Anzahl fibrotisch aktiver Zellen in fibrotischen Nieren von CD73-KO und WT Mäusen gibt, wurde eine FACS-Analyse des fibrotischen Nierengewebes, isoliert aus Tieren beider Genotypen, durchgeführt. Bei den während der Fibrose aktivierten Zellen handelt es sich häufig um Leukozyten. Daher wurden die Zellzahlen verschiedener weißer Blutzellen in der fibrotischen Niere bestimmt. Im Vergleich von fibrotischen CD73-KO und WT Nieren, wurden für die Anzahl von Gr-1+, Gr-1-Monozyten, Granulozyten, B-Lymphozyten, CD4+, CD8+ T-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) und F4/80+ Makrophagen keine signifikanten Unterschiede festgestellt (Abb. 22). Jedoch wurden in fibrotischen Nieren von CD73-KO Mäusen eine signifikant niedrigere Anzahl an CD11b+, CD45+, Col I+ Fibrozyten detektiert. Die Fibrozytenzahl in fibrotischen CD73-KO Nieren betrug dabei $57 \pm 5\%$ der Zellzahl in WT-Nieren ($n=8$, $p<0,05$ für WT vs. KO) (Abb. 23). Somit wanderten in CD73-defizientes Nierengewebe weniger Fibrozyten ein als in CD73-positives.

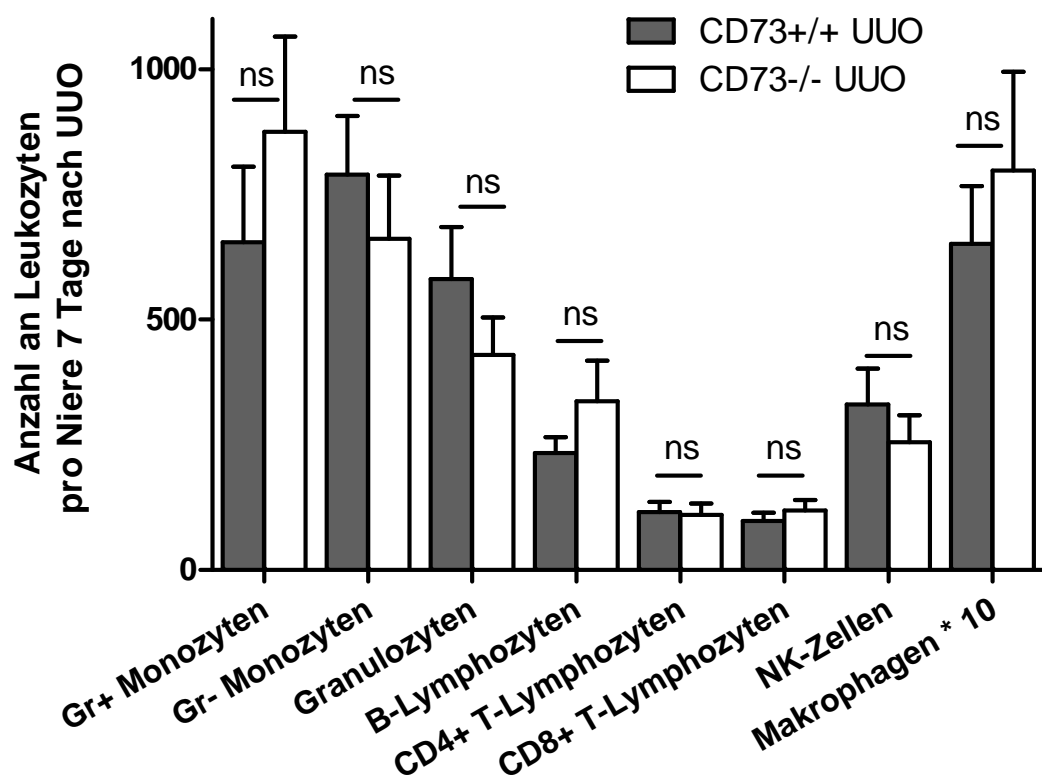


Abb. 22: FACS-Analyse der Zellzahlen von Leukozyten in fibrotischem CD73-KO und WT Nierengewebe.

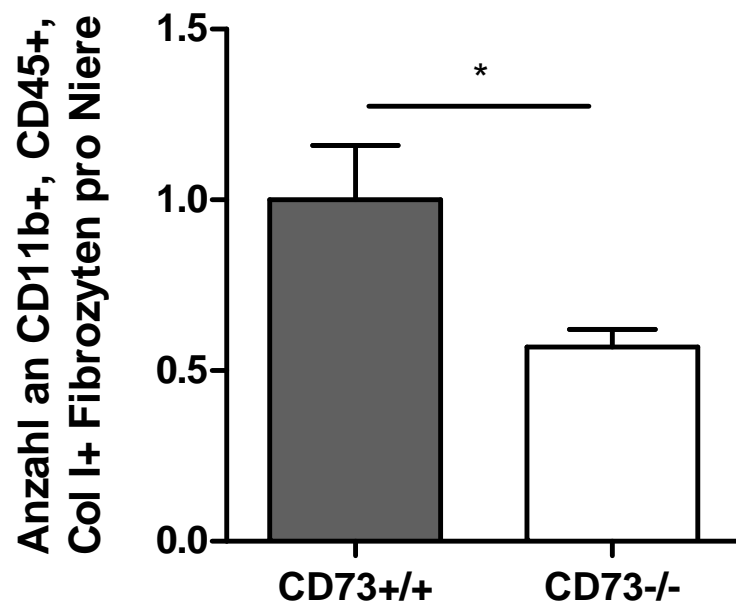


Abb. 23: FACS-Analyse der Zellzahlen von Markophagen und Fibrozyten in fibrotischem CD73-KO und WT Nierengewebe.

4.6 Differenzierung von Monozyten zu Fibrozyten im Abhängigkeit von der CD73-Expression

Der Einfluss von CD73 auf die Differenzierung von Monozyten zu Fibrozyten wurde in Zellkultur überprüft. Hierzu wurden Monozyten, die aus Milzen von CD73-KO und WT Mäusen isoliert wurden, jeweils zusammen mit CD4+/CD73+ T-Lymphozyten inkubiert. Es ist bekannt, dass CD4+ T-Lymphozyten Monozyten zur Differenzierung zu Fibrozyten stimulieren (Niedermeier, Reich et al. 2009). Nach sieben Tagen wurde die Zahl der Fibrozyten, sowie die Collagen I-Produktion der einzelnen Zellkulturansätze bestimmt. Die Zellzahl an CD73-defizienten Monozyten, die sich in Anwesenheit von CD73+ T-Lymphozyten zu Fibrozyten differenzierten entsprach $79 \pm 5\%$ der Zellzahl an differenzierten WT-Fibrozyten (Abb. 24, 25). Die Anzahl an CD73-negativen Fibrozyten änderte sich im Bezug auf WT-Fibrozyten nicht, wenn die Monozytenkulturen mit CD73-defizienten CD4+ T-Zellen co-inkubiert wurden. Die Anzahl an Fibrozyten aus CD73-KO-Monozyten entsprach in diesen Zellkulturansätzen $83 \pm 6\%$ der WT Fibrozyten (Abb. 24,25). Somit zeigte eine CD73-Expression einen stärkeren Einfluss auf Monozyten als auf CD4+T-Lymphozyten bezüglich einer Zelldifferenzierung.

Um einen Anhaltspunkt dafür zu erhalten, ob CD73 im beschriebenen Experiment als Oberflächenprotein eine Aktivierung spezieller Zellen hervorruft oder ob eine Veränderung der Adenosinkonzentration Grund für die veränderte Zelldifferenzierung ist, wurde der Zellkulturansatz mit verschiedenen AMP-Konzentrationen wiederholt. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Differenzierung von Monozyten zu Fibrozyten in Abhängigkeit der AMP-Konzentration festgestellt werden (Abb. 26).

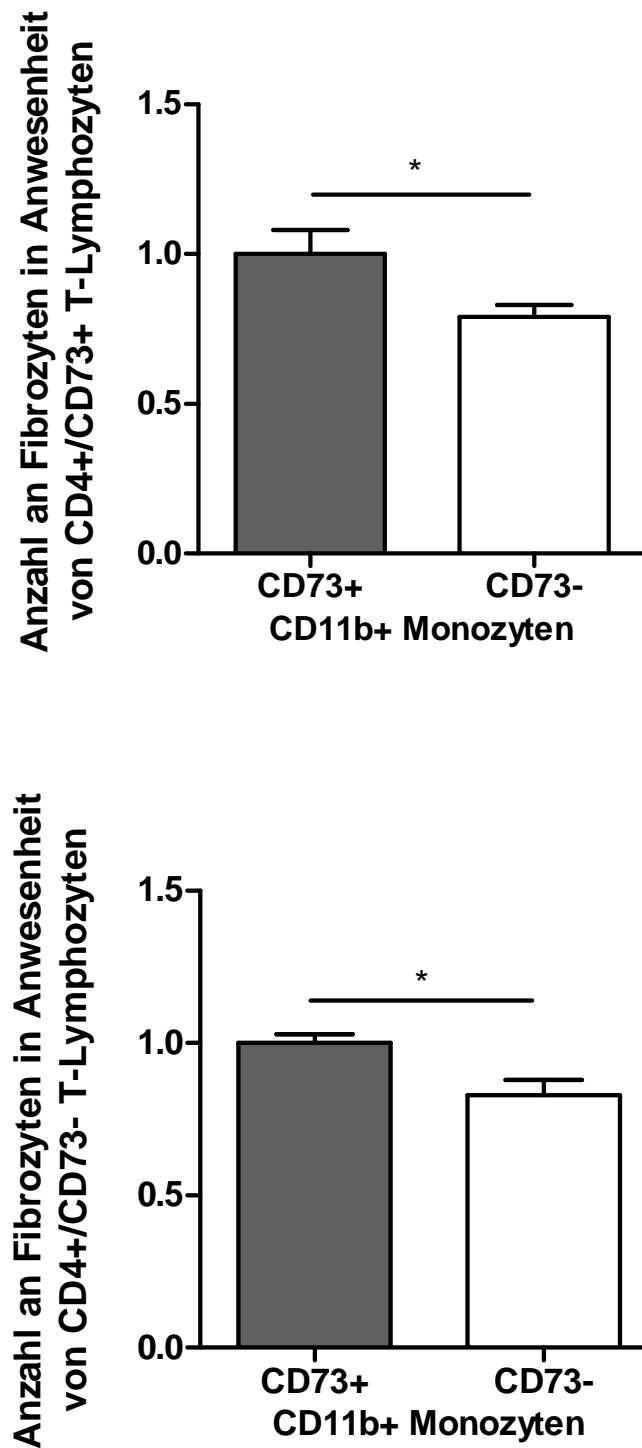


Abb. 24: Fibrozytenanzahl nach Co-Inkubation von CD73+ und CD73- Monozyten und CD4+ T-Lymphozyten, isoliert aus Milzen von CD73- WT oder -KO Mäusen.

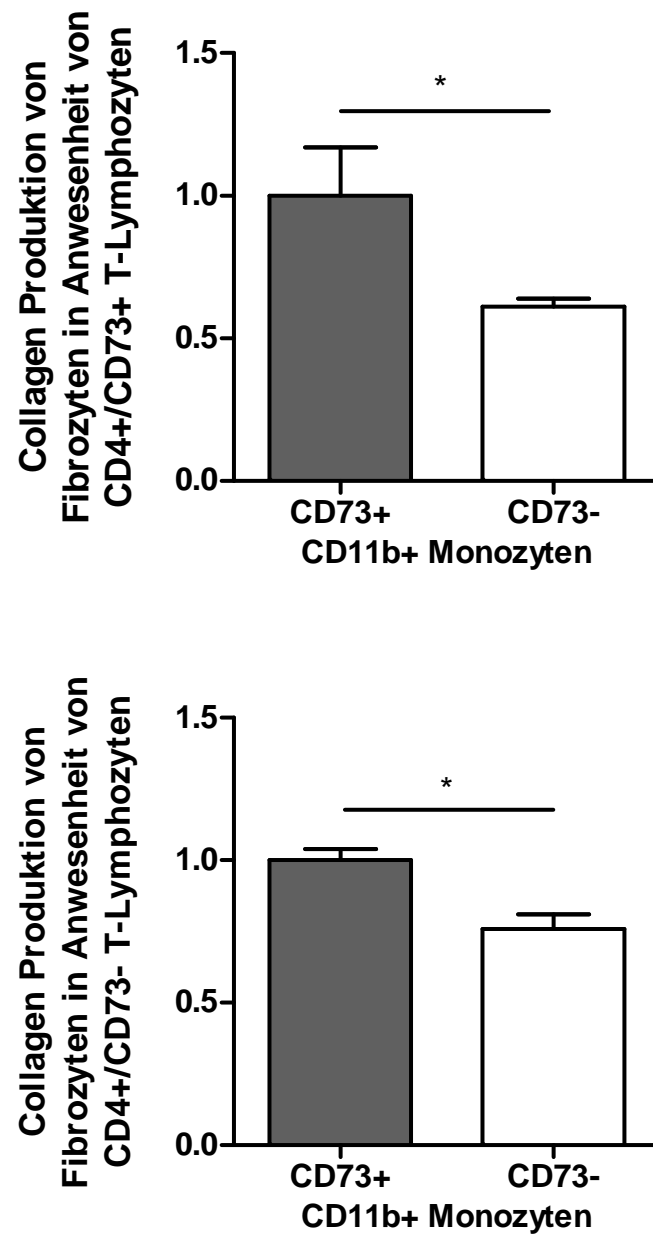


Abb. 25: Ergebnisse eines Collagen I ELISA: Gehalt an extrazellulärem Collagen I nach Co-Inkubation von CD73+ und CD73- Monozyten und CD4+ T-Lymphozyten, isoliert aus Milzen von CD73- WT oder -KO Mäusen.

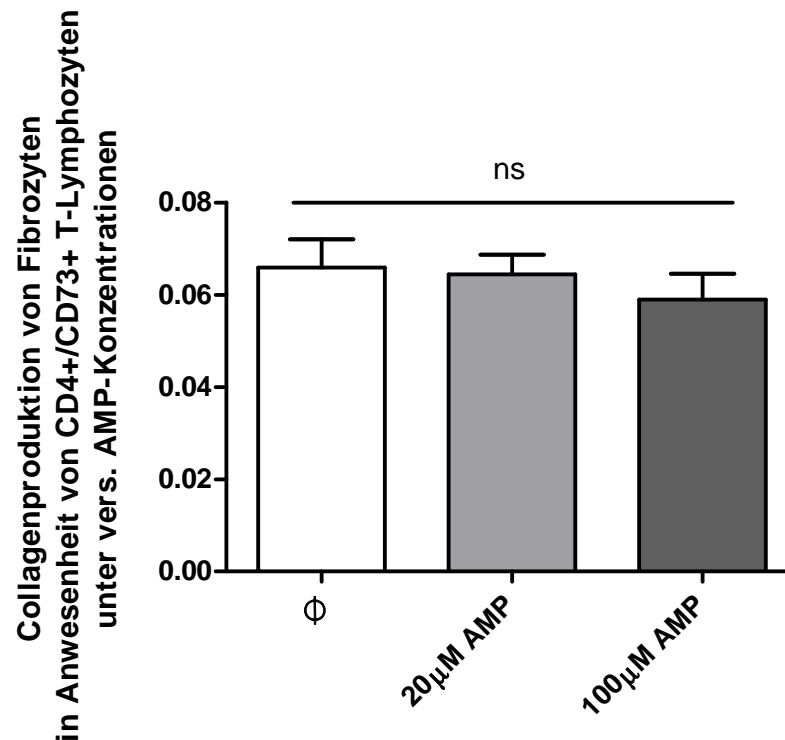


Abb. 26: Ergebnisse eines Collagen I ELISA: Gehalt an extrazellulärem Collagen I nach Co-Inkubation von CD73+ und CD73- Monozyten und CD4+ T-Lymphozyten, isoliert aus Milzen von CD73-WT oder -KO Mäusen in Abhängigkeit der AMP-Konzentration im Medium.

Mit CD4+ T-Zellen co-inkubierte CD11b+ Monozyten differenzierten sich zu einer größeren Anzahl zu Fibrozyten, wenn diese aus CD73-positiven WT Tieren stammten. Dabei konnte parallel zur erhöhten Zellzahl auch eine Zunahme der Sekretion an Collagen I durch die Fibrozyten gemessen werden. Es wurde kein Unterschied der Zellzahl bei Zugabe von AMP festgestellt.

4.7 Entwicklung der renalen Fibrose in Abhängigkeit einer CD73-Expression auf hämatopoetischen Stammzellen

Um genauere Erkenntnisse über den Wirkungsmechanismus von CD73 innerhalb der Fibroseentstehung zu gewinnen, wurde untersucht, ob CD73 einen unterschiedlichen Einfluss auf renale Zellen oder hämatopoetische Stammzellen (hSZ) ausübt. Dazu wurden CD73-KO und WT Mäuse zunächst einer letalen Gammastrahlung (9,5 Gy) ausgesetzt, wodurch eine Zerstörung der hämatopoetischen Stammzellen erzielt wurde. Daraufgehend wurden den Tieren Stammzellen, isoliert aus CD73-KO oder WT Mäusen, retransplantiert. Somit

entstanden vier Versuchsgruppen wobei jeweils die Hälfte der CD73-KO und WT-Mäuse CD73-KO Stammzellen und die andere Hälfte WT-Stammzellen erhielten (Schema siehe 3.3.14). Nach einer Regenerationsperiode von acht Wochen wurden bei allen Versuchstieren UUOs durchgeführt und sieben Tage danach die Nieren entnommen. Anschließend wurde die mRNA-Expression von CD73, fibrotischer Markergene und der Proteingehalt der ECM-Moleküle α SMA, Fibronectin und Gesamtcollagen bestimmt.

Die mRNA Expression von CD73 war in fibrotischen Nieren von WT-Mäusen, die WT-SZ erhalten hatten, im Vergleich zu den contralateralen Kontrollnieren hochreguliert.

Dabei unterschied sich die CD73-Expression nicht signifikant von Werten in fibrotischen Nieren aus WT Tieren, die mit CD73-KO-SZ transferiert waren. CD73-defiziente Tiere, die CD73-KO-SZ enthielten, zeigten keine CD73 mRNA Expression. Jedoch konnte in der Gruppe CD73-KO/WT-SZ eine, im Vergleich zu WT-Tieren geringe, CD73 mRNA Expression festgestellt werden. Dabei war die Expression in fibrotischen Nieren dieser Gruppe, im Vergleich zu den contralateralen Nieren, signifikant erhöht.

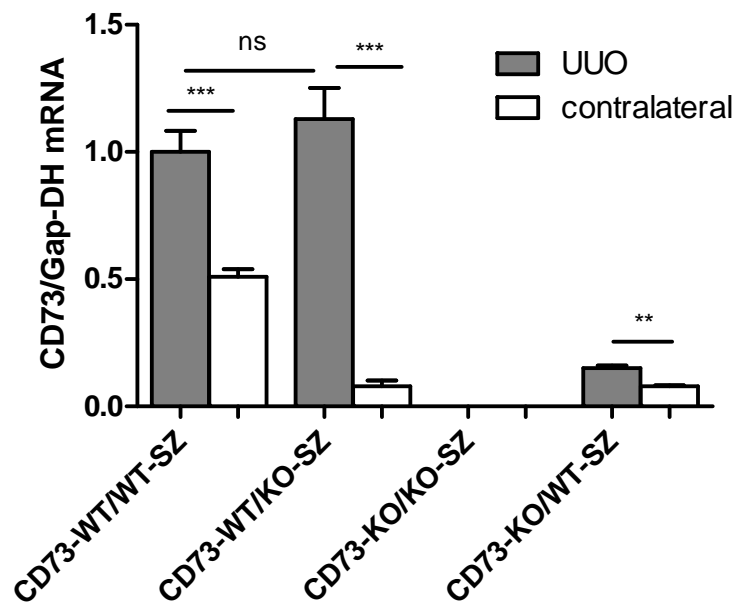
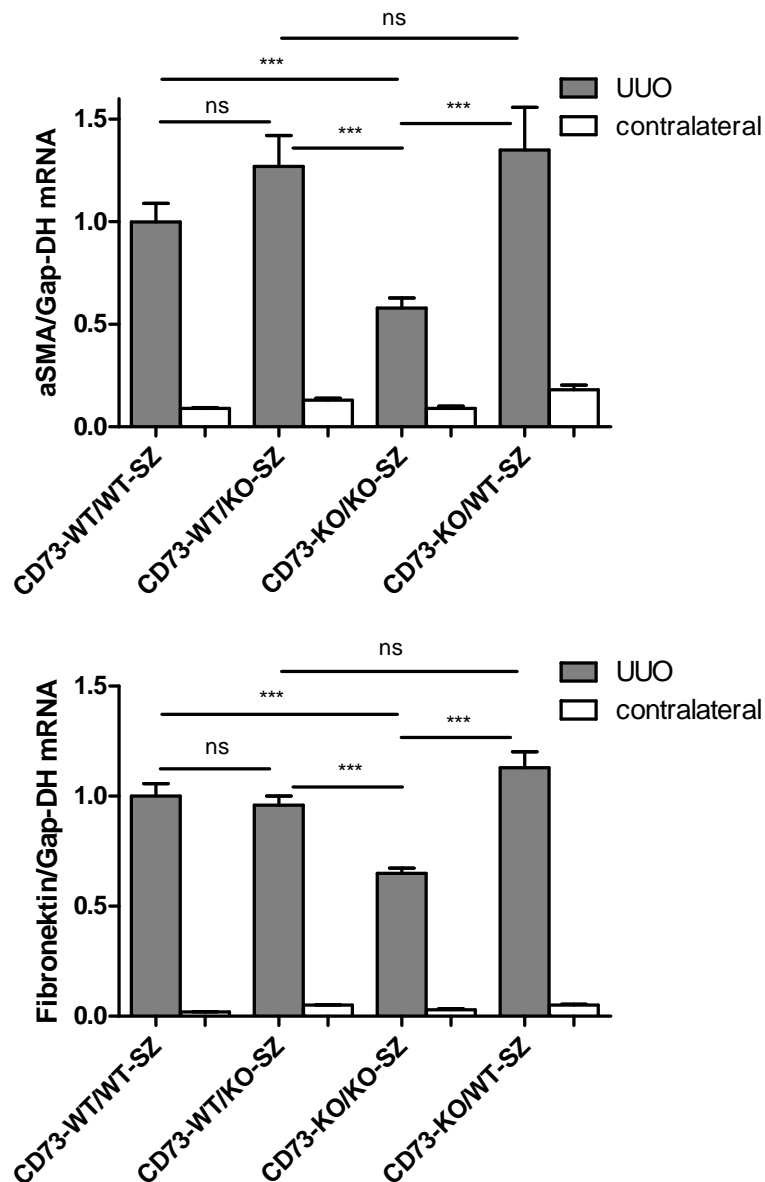


Abb. 27: CD73 mRNA Expression in fibrotischen und contralateralen Nieren von CD73-KO und WT Mäusen, transferiert mit CD73-KO oder WT hSZ.

Das entnommene Nierengewebe der retransplantierten Mäuse wurde auf die mRNA Expressionen verschiedener Markergene hin untersucht. Dabei wurden für die ECM-Gene von α SMA, Fibronektin und für die Collagene 1a1,1a2 und 3a1 ähnliche Expressionensunterschiede zwischen den einzelnen Gruppen gefunden. In fibrotischen Nieren aller vier Versuchsgruppen wurden, im Vergleich zu contralateralen Kontrollnieren, erhöhte mRNA Expressionen aller getesteter ECM-Gene ermittelt. Zwischen den fibrotischen Nieren aus den Gruppen CD73-WT/WT-SZ, CD73-WT/KO-SZ und CD73-KO/KO-SZ konnten keine signifikanten Unterschiede der mRNA Expressionen von α SMA, Fibronektin und für die Collagene 1a1,1a2 und 3a1 festgestellt werden. Jedoch waren die mRNA Werte für die fibrotischen Nieren aus CD73-KO/KO-SZ Mäusen im Bezug auf diese beschriebenen drei Gruppen signifikant erniedrigt.



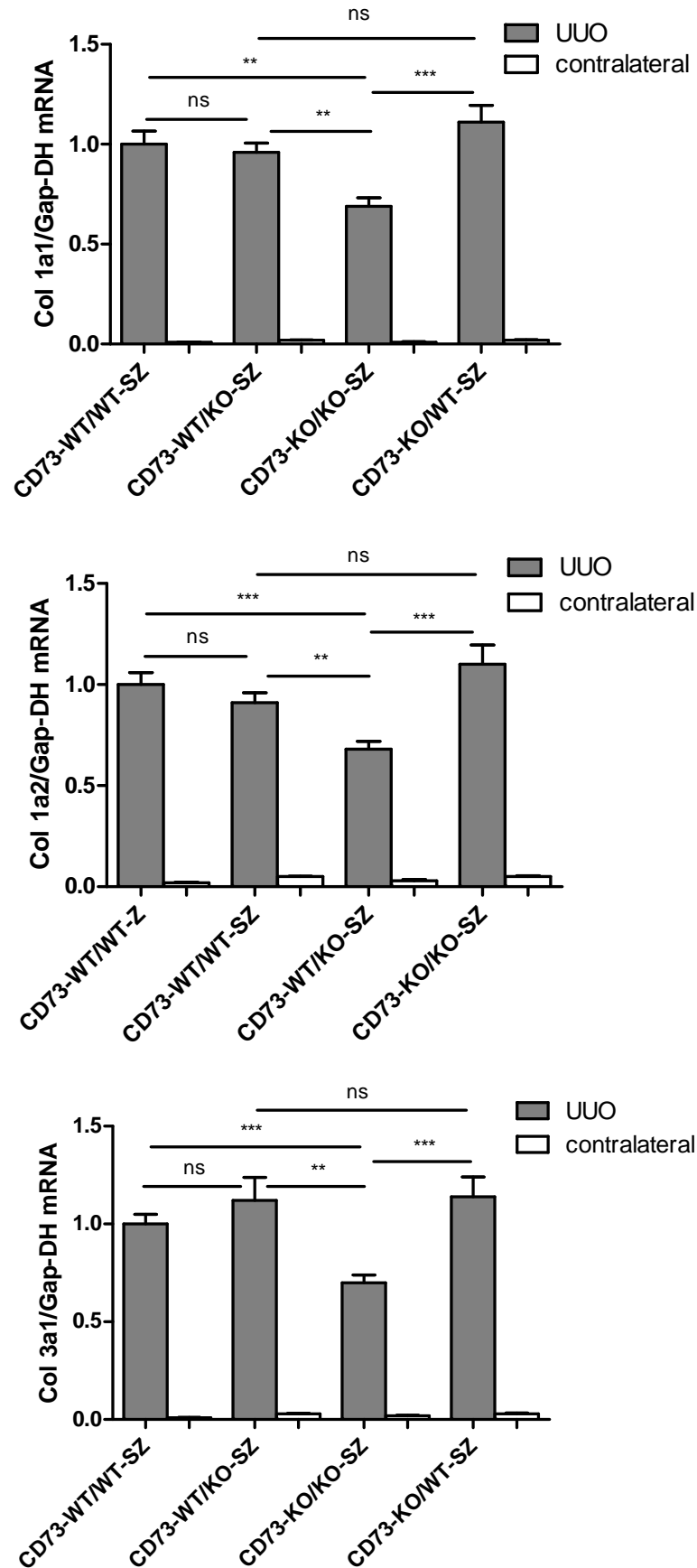


Abb. 28: mRNA Expressionen der ECM-Moleküle α SMA, Fibronectin und der Collagene 1a1, 1a2, 3a1 in fibrotischen und contralateralen Kontrollnieren von CD73-KO und WT Mäusen, transferiert mit CD73-KO oder WT hSZ.

Zusätzlich zu den mRNA Expressionen wurden ebenfalls die Proteinexpressionen der ECM-Moleküle α SMA, Fibronectin und des Gesamtcollagens mittels Quantifizierung von Proteinfärbungen ermittelt. Der ECM-Proteingehalt war dabei in allen fibrotischen Gruppen, im Vergleich zu den contralateralen Kontrollnieren erhöht. Die Versuchsgruppe der CD73-KO/KO-SZ zeigte in fibrotischen Nieren einen niedrigeren Proteinanteil an α SMA, Fibronectin und Gesamtcollagen, im Vergleich zu fibrotischen Nieren aus CD73-WT/WT-SZ, CD73-WT/KO-SZ und CD73-KO/WT-SZ Mäusen. Fibrotische Nieren aus CD73-WT/WT-SZ, CD73-WT/KO-SZ und CD73-KO/WT-SZ Tieren enthielten keine unterschiedlichen Mengen an ECM-Proteinen.

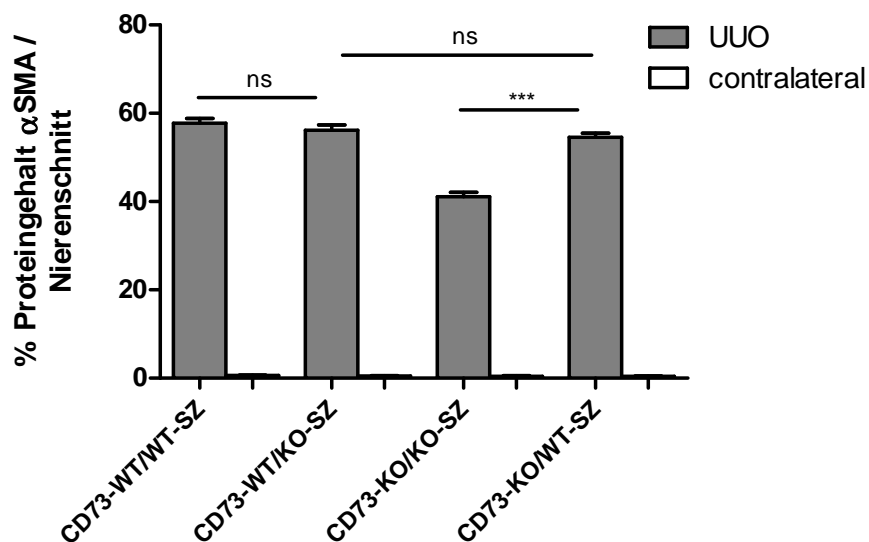


Abb. 29: Proteingehalt an α SMA pro Nierengewebeschnitt (%) aus fibrotischen und contralateralen Kontrollnieren von CD73-KO und WT Mäusen, transferiert mit CD73-KO oder WT-hSZ. Nierenschnitte wurden aus cryopreserviertem Nierengewebe hergestellt. α SMA-Proteine wurden immunohistochemisch mit primären Maus-anti- α SMA und sekundären anti-Maus-Cy2 Antikörpern detektiert. Anschließend wurde mittels der Software Metamorph der Gehalt an α SMA quantifiziert.

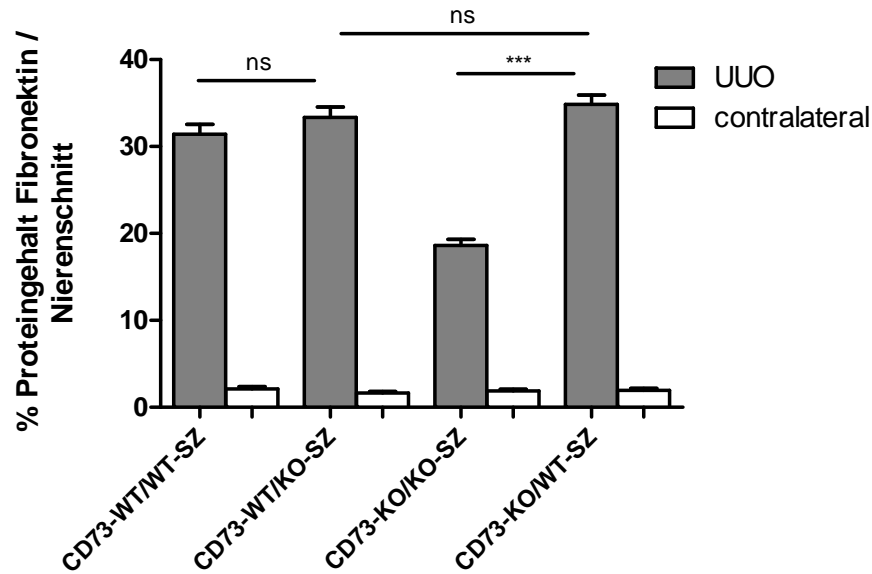


Abb. 30: Proteingehalt an Fibronectin pro Nierengewebeschnitt (%) aus fibrotischen und contralateralen Kontrollnieren von CD73-KO und WT Mäusen, transferiert mit CD73-KO oder WT-hSZ. Nierenschnitte wurden aus cryopreserviertem Nierengewebe hergestellt. Fibronectinproteine wurden immunohistochemisch mit primären Kaninchen-anti-Fibronectin und sekundären anti-Kaninchen-Tritc Antikörpern detektiert. Anschließend wurde mittels der Software Metamorph der Gehalt an Fibronectin quantifiziert.

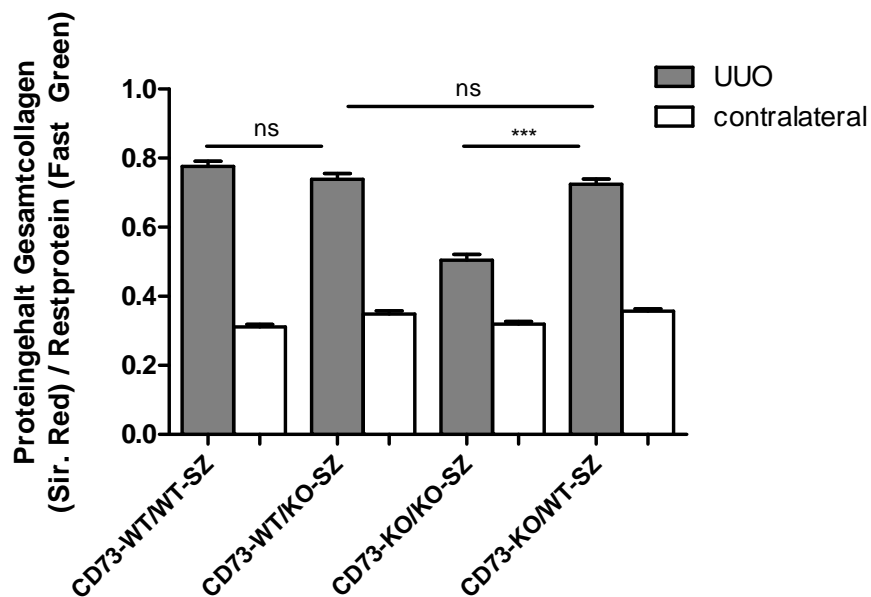


Abb. 31: Proteingehalt an Gesamtcollagen in Bezug auf den Gehalt an Restprotein pro Nierengewebeschnitt aus fibrotischen und contralateralen Kontrollnieren von CD73-KO und WT Mäusen, transferiert mit CD73-KO oder WT-hSZ. Nierenschnitte wurden aus cryopreserviertem Nierengewebe hergestellt. Collagene und Restproteine wurden mittels einer Sirius Red und Fast Green Färbung detektiert. Anschließend wurde der Proteingehalt in den Nierengewebeschnitten mittels der Software Metamorph quantifiziert.

Neben fibrotischen Markern, wie den ECM-Bestandteilen, wurden in fibrotischen und contralateralen Nieren aus bestrahlten und hSZ-transferierten Tieren auch mRNA Expressionen des fibrotischen Mediators TGF- β ermittelt. Dabei wurden keine Unterschiede in TGF- β mRNA Expressionen zwischen fibrotischen Nieren von WT-Tieren, die WT oder CD73-KO hSZ erhalten hatten gefunden. Fibrotische Nieren aus CD73-KO Mäusen, die mit WT hSZ transplantiert waren, enthielten erhöhte mRNA Expressionen im Vergleich zu fibrotischen CD73-KO/KO-SZ Nieren. Beide fibrotische CD73-KO Gruppen wiesen jedoch geringere Werte an TGF- β mRNA auf als die fibrotischen WT-Gruppen.

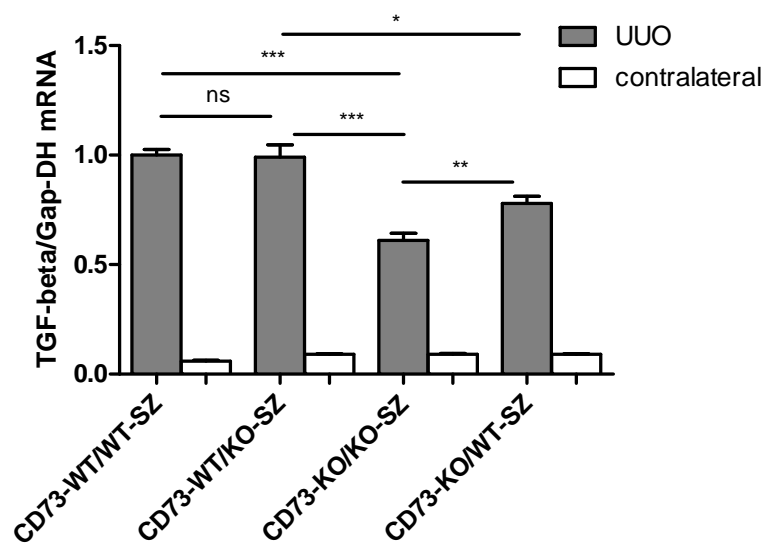


Abb. 32: mRNA Expressionen von TGF- β , in fibrotischen und contralateralen Kontrollnieren von CD73-KO und WT Mäusen, transferiert mit CD73-KO oder WT hSZ.

Zusätzlich zu fibrotischen Zytokinen wurden auch mRNA Expressionen zellspezifischer Marker, wie dem Fibroblasten-spezifischen Protein (FSP-1) und dem Monozyten-chemotaktischen Protein (MCP-1) ermittelt. Hierbei waren die FSP-1 mRNA Expressionen in fibrotischen Nieren von CD73-WT/WT-SZ, CD73-WT/KO-SZ und CD73-KO/WT-SZ nicht signifikant unterschiedlich. Im Vergleich zu diesen drei Gruppen waren jedoch in fibrotischen CD73-KO/KO-SZ Nieren geringere mRNA Expressionen für FSP-1 messbar. Der Vergleich fibrotischer Nieren aller vier Versuchsgruppen zeigte keine Unterschiede zwischen MCP-1 mRNA Expressionen.

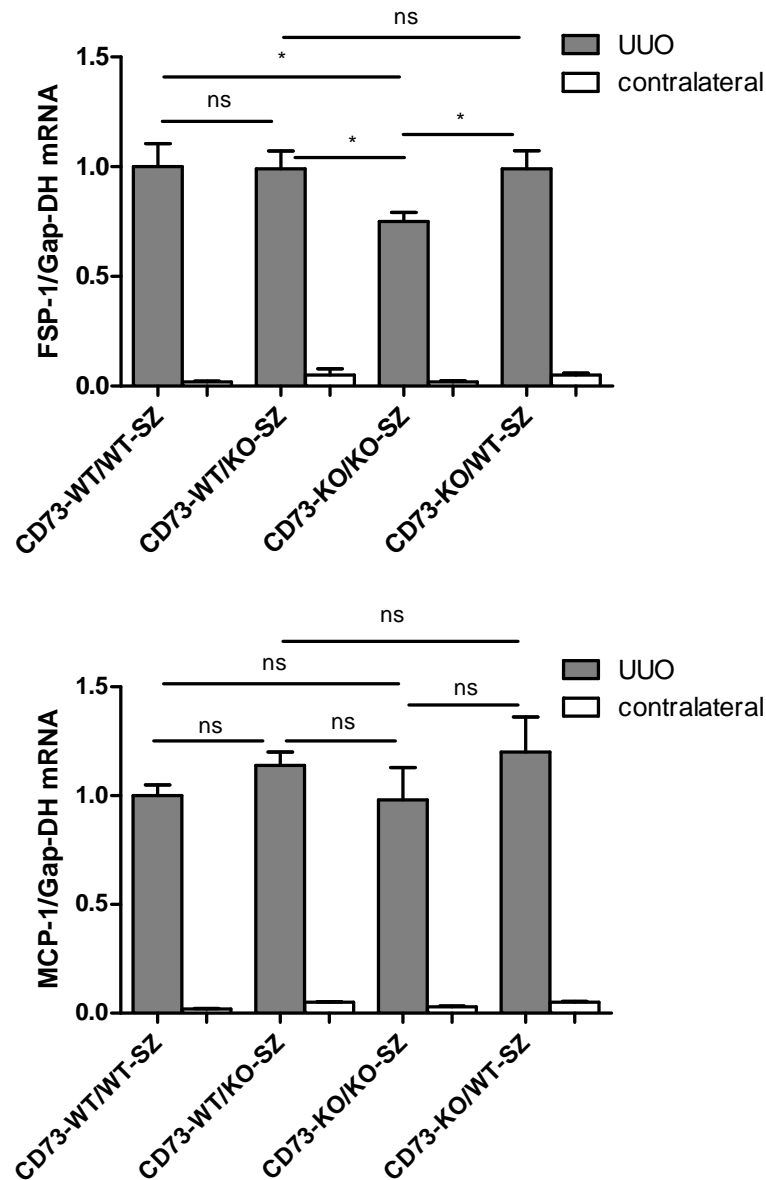


Abb. 33: mRNA Expressionen der zellspezifischen Markergene FSP-1 und MCP-1 in fibrotischen und contralateralen Kontrollnieren von CD73-KO und WT Mäusen, transferiert mit CD73-KO oder WT hSZ.

In Versuchsgruppen von CD73-WT Tieren, die WT-SZ oder KO-SZ enthielten, sowie in CD73-KO Mäusen, die WT-SZ transferiert bekommen hatten wurden in fibrotischen Nieren ähnliche mRNA Expressionen und Proteinkonzentrationen bzgl. ECM-Moleküle und fibrotischer Marker festgestellt. In CD73-defizienten Tieren, die mit CD73-KO SZ transplantiert waren, waren die Werte in fibrotischen Nieren bzgl. der untersuchten Moleküle sowohl auf mRNA, als auch auf Proteinebene im Vergleich zu den anderen Gruppen erniedrigt.

5. Diskussion

Renale Fibrose entsteht im Verlauf einer chronischen Nierenerkrankung und manifestiert sich als Glomerulosklerose oder tubulointersitielle Fibrose, die sich durch eine übermäßige Produktion an ECM auszeichnet. Ungeachtet der ursprünglichen Ursache der Nierenschädigung, zerstört die Krankheit im chronischen Verlauf das Parenchym und resultiert letztendlich in einem Versagen der Organfunktion, welches dazu führt, dass betroffene Patienten einer Dialyse oder einer Nierentransplantation bedürfen. Um neue Behandlungsmethoden der renalen Fibrose zu erforschen, müssen vor allem die Mechanismen der Fibroseentstehung aufgeklärt werden. Dabei gilt es zu beantworten, welche Zelltypen während der Fibrogenese aktiv sind und durch welche Faktoren die Produktion von ECM reguliert wird. In Organen wie Leber, Lunge und der Haut konnte ein Zusammenhang zwischen der Entwicklung einer Fibrose und der Ekto-5'-Nukleotidase (CD73) hergestellt werden. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, welche Funktion CD73 innerhalb der Entwicklung der renalen Fibrose einnimmt.

Zunächst wurde überprüft, ob die Expression von CD73 im fibrotischen Nierengewebe reguliert ist. Eine Hochregulation der CD73 mRNA, ihrer Proteinexpression, sowie ihrer funktionalen Aktivität ist im Modell der toxin-induzierten Leberfibrose in Ratten beschrieben worden. In dieser Studie wurden erhöhte Level an CD73 mRNA und Protein in fibrotischen Myofibroblasten, die sich aus Sternzellvorläufern gebildet hatten, festgestellt (Fausther, Sheung et al. 2012). Bezüglich der CD73 Expression in der renalen Fibrose liegen jedoch bisher keine Informationen vor. Deshalb wurde in WT Mäusen mittels unilateraler Ureterligaturen (UUOs) eine renale Fibrose induziert und den Tieren sieben Tage nach OP die Nieren entnommen. Im fibrotischen Nierengewebe zeigte sich, im Vergleich zu contralateralen Kontrollnieren, eine Induktion der CD73 mRNA und Proteinexpression. Dieses Ergebnis lieferte einen ersten Anhaltspunkt dafür, dass ein Zusammenhang zwischen einer vermehrten Produktion von CD73 und der Regulation der renalen Fibrogenese bestehen könnte, wie es bereits für die Ausbildung einer hepatischen Fibrose beschrieben wurde. In Versuchen mit CD73-defizienten Mäusen, die eine toxin-induzierte hepatische Fibrose

entwickelt hatten, konnten, verglichen zu WT Tieren, geringere Level an ECM und fibrotischen Mediatoren, wie TGF- β nachgewiesen und somit ein geringerer Grad an Leberfibrose festgestellt werden (Peng, Fernandez et al. 2008). Parallel dazu sollte getestet werden, welche Wirkung ein Fehlen von CD73 innerhalb der Entwicklung der Nierenfibrose besitzt.

Um genauere Aufschlüsse über den Einfluss von CD73 auf die renale Fibrogenese zu erhalten, wurden Experimente an CD73-defizienten und WT Mäusen durchgeführt.

Eine Fibrose ist vor allem durch eine vermehrte Produktion an ECM charakterisiert. Nach einer Gewebeverletzung werden verschiedene Zellen wie Fibroblasten, Myofibroblasten oder Fibrozyten zur Herstellung und Sekretion von α SMA, Fibronectin oder Collagen aktiviert. Diese Bestandteile der ECM lagern sich im Extrazellularraum ab und können bei starker Ausbreitung das Tubulolumen einengen, was zu einer Einschränkung der Filtrationsleistung führt (Eknoyan, McDonald et al. 1990; Klahr and Morrissey 2002). Der Gehalt an ECM Molekülen im fibrotischen Gewebe liefert somit einen Anhaltspunkt für den Grad der Fibroseentwicklung. Erste Ergebnisse der mRNA Expressionen, der ECM-Bestandteile α SMA, Fibronectin und der Collagene I und III zeigten, dass diese sowohl in fibrotischen WT, als auch in CD73-KO Nieren, im Vergleich zu Kontrollnieren, hochreguliert waren und somit die Fibroseinduktion durch UUO erfolgreich war. Jedoch entsprachen die mRNA Expressionsdaten der ECM-Gene in Abwesenheit von CD73 durchschnittlich nur 50% der Genexpressionslevel im WT. Durch Western Blot Analysen und Gewebefärbungen wurde zusätzlich der Proteingehalt an ECM im Nierengewebe untersucht. Hier wurde ebenfalls ein niedrigerer Anteil an α SMA, Fibronectin und Gesamtcollagen im fibrotischen Gewebe von CD73-defizienten Nieren festgestellt. Somit konnte Tieren, die kein CD73 exprimierten, ein Schutz gegenüber einer vermehrten Produktion von ECM-Molekülen und infolgedessen ein Schutz gegenüber der Ausbildung einer renalen Fibrose zugeschrieben werden. Der Befund, dass CD73 die Produktion an ECM in der Fibroseentwicklung vermittelt, wurde ebenfalls in Organen wie der Leber festgestellt. Im toxin-induzierten Leberfibrosemodell konnte in Ratten eine CD73-abhängige Differenzierung von Sternzellen in den Myofibroblastenphänotyp beschrieben werden (Fausther, Sheung et al. 2012). Dabei produzierten die

aktivierten hepatischen Sternzellen in der fibrotischen Leber vermehrt ECM-Moleküle, wie α SMA.

Die Stimulation zur ECM-Produktion und Sekretion wird durch verschiedene Botenstoffe vermittelt. Das fibrotische Nierengewebe von CD73-KO und WT Mäusen wurde deshalb ebenfalls hinsichtlich der Genexpression verschiedener, in der Fibrose aktiver, Zytokine und anderer Proteine untersucht. Ein zentraler Mediator in der Fibrogenese ist TGF- β , welches durch einen Entzündungsreiz ausgeschüttet wird, verschiedene Zellen zur ECM-Produktion anregt und somit profibrotisch wirkt. In fibrotischen Nieren von CD73-negativen Mäusen wurde, verglichen mit dem WT, ein niedrigerer mRNA Gehalt an TGF- β festgestellt. Dies könnte ein möglicher Grund für den geringeren ECM Anteil in fibrotischen CD73-KO Nieren sein, da TGF- β einen initialen Stimulus der ECM-Produktion darstellt (Border and Noble 1997). Für TGF- β ist des Weiteren nachgewiesen worden, dass es die Oberflächenexpression von CD73 auf T-Lymphozyten nach Aktivierung durch LPS erhöht (Regateiro, Howie et al. 2011). Ein erhöhtes Level an TGF- β , wie es in fibrotischen Nieren von CD73-WT Mäusen gefunden wurde, könnte somit für die ebenfalls festgestellte erhöhte CD73 Expression im fibrotischen WT mitverantwortlich sein. Demzufolge könnten TGF- β und CD73 gemeinsam eine vermehrte Induktion der ECM-Anreicherung und somit ein Fortschreiten der renalen Fibrose beeinflussen.

Zusätzlich zu TGF- β wurde das Nierengewebe auf weitere Entzündungsfaktoren, wie IL-6 oder IFN- γ hin untersucht, welche ebenfalls die Fibrogenese stimulieren. Auch für diese Chemokine wurden im fibrotischen CD73-KO niedrigere mRNA Expressionen als im WT Nierengewebe gefunden. Zusammen mit dem verringerten Level an TGF- β spricht dies für einen verminderten Entzündungsgrad im CD73-KO.

Neben profibrotischen Regulatoren, wurden auch die mRNA Expressionen für antifibrotische Zytokine untersucht. Für das antientzündlich wirkende TNF- α , sowie für die ECM-degradierenden Matrixmetalloproteinasen MMP-2, -13 und -14 wurden hierbei in fibrotischen Nieren von CD73-defizienten Tieren niedrigere mRNA Level als im Vergleich zum WT gemessen. Eine Erklärung für die verringerte Expression der antifibrotisch wirkenden Mediatoren TNF- α und MMPs kann der abgemilderte Fibrosegehalt im CD73-KO sein. Eine verringerte

Schädigung, wie sie in Nieren von CD73-defizienten Mäusen, durch eine niedrigere Produktion an ECM, gefunden wurde, würde folglich zu einer Abschwächung des Entzündungsreizes führen, durch die ebenfalls die Sekretion der antifibrotischen Mediatoren, wie TNF- α und MMPs, herabgesetzt würde.

Durch eine verstärkte Ablagerung von ECM und eine verstärkte Reduktion des gesunden Nierenparenchyms während der Fibroseentwicklung, sinkt zunehmend die Nierenfunktion. Deshalb ist es von Bedeutung, nicht nur den Anteil an fibrotischem Gewebe zu überprüfen, sondern auch die verbleibende Funktion im fibrotischen Organ zu bestimmen.

Da CD73 die Produktion an ECM zu beeinflussen scheint, sollte überprüft werden, ob dies auch einen Einfluss auf die glomeruläre Filtration hat. Deshalb wurden Messungen der glomerulären Filtrationsraten (GFR) vor und nach einer reversiblen UUO durchgeführt. Basismessungen der GFR vor UUO zeigten keine unterschiedlichen Werte zwischen CD73-KO und WT. Sechs Tage nach Ligatur des linken Ureters wurde diese entfernt und am darauffolgenden Tag der contralaterale, rechte Ureter abgebunden. Dadurch konnte die GFR der fibrotischen Niere bestimmt werden. Während nach Induktion der renalen Fibrose die GFR im fibrotischen WT auf 18% der ursprünglichen GFR sank, reduzierte sich die GFR im CD73-KO lediglich auf 70% der Basis-GFR. Folglich wurde die renale Funktion in CD73-defizienten Tieren, während der Fibroseentwicklung, durch das Fehlen von CD73 geschützt. Somit geht die verringerte Produktion fibrotischer Mediatoren und ECM mit einer verbesserten Nierenfunktion einher. Daher könnte CD73 ein möglicher pharmakologischer Angriffspunkt für die Aufrechterhaltung der renalen Filtration während einer fibrotischen Erkrankung sein.

Die physiologische Funktion von CD73 beinhaltet hauptsächlich die enzymatische Dephosphorylierung von extrazellulärem AMP zu Adenosin. Es sind jedoch auch nicht-enzymatische Funktionen für CD73 bekannt, wie die als Co-Rezeptor in der T-Zell-Aktivierung oder die als Zelladhäsionsmolekül zwischen Lymphozyten und Endothelien (Airas, Hellman et al. 1995; Resta and Thompson 1997). Adenosin ist ein Regulator der Wundheilungsreaktion (Cronstein 2011). Dabei stimuliert eine erhöhte Adenosinkonzentration, wie sie in entzündetem Gewebe nachgewiesen wurde, z.B. über A2a-Rezeptoren, die

Differenzierung von Makrophagen in ihren M2-Phänotyp, der die Wundheilung, durch die Sekretion entzündungshemmender Faktoren wie VEGF (vascular endothelial growth factor) anregt (Leibovich, Chen et al. 2002; Pinhal-Enfield, Ramanathan et al. 2003). Somit wird Adenosin ein antiinflammatorisches Potential zugeschrieben. Jedoch kann diese Anregung zur Wundheilung ebenfalls zu einer erhöhten Produktion an ECM führen, wie sie in fibrotischen Erkrankungen auftritt. In diesem Zusammenhang wurde nachgewiesen, dass Adenosin im dermalen Fibrosemodell durch die Aktivierung von A2a Rezeptoren, Fibroblasten zu einer vermehrten Collagenproduktion antreibt (Chan, Fernandez et al. 2006). Dies wurde durch Studien bestätigt, bei denen die Behandlung von Mäusen mit AR-A2a-Antagonisten zu einem Schutz gegenüber der Entwicklung einer dermalen Fibrose führte. Neben der Aktivierung von Fibroblasten zur Collagenbereitstellung, hilft Adenosin ebenfalls bei der Rekrutierung von zirkulierenden Fibrozyten aus dem Knochenmark zu fibrotischen Hautpartien (Cronstein 2011). Antifibrotische Adenosineffekte wurden auch in Studien zur hepatischen Fibrose beschrieben. Im Modell der alkohol-induzierten Fettleber (Steatosis hepatis), konnte bestätigt werden, dass eine AR-A2a vermittelte Adenosinwirkung zu einer vermehrten Produktion von Collagen I und III durch hepatische Sternzellen führt (Chan, Montesinos et al. 2006). Als weiteres Beispiel für eine adenosinvermittelte Fibroseentwicklung ist die Lungenfibrose zu nennen. Interstitielle Fibrose im Lungengewebe wird vor allem in einen Zusammenhang mit der Stimulation des AR-A2b gestellt, der laut Theorie die IL-6 Abgabe anregt und dadurch die Fibroseentstehung indirekt vermitteln soll (Schneider, Lindsay et al. 2010). Somit könnte die durch CD73 regulierte Adenosinkonzentration ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Entwicklung renaler Fibrose spielen. Im Rahmen der durchgeführten Arbeiten war es nicht möglich, die Adenosinkonzentrationen im extrazellulären Raum zu messen. In Untersuchungen von CD73-defizienten und WT Mäusen konnte bestätigt werden, dass nach Induktion einer hepatischen Fibrose die Adenosinkonzentrationen sowohl im fibrotischen WT als auch im CD73-KO Lebergewebe deutlich anstiegen, jedoch war dabei die Konzentration im CD73-KO im Vergleich zum WT verringert (Peng, Fernandez et al. 2008). Dieser Befund wurde ebenfalls in hepatischen Fibroseversuchen mit CD73-KO und WT Tieren festgestellt. Somit könnte auch für das hier verwendete Modell der renalen Fibrose angenommen

werden, dass ein Fehlen von CD73 in KO-Mäusen eventuell zu einer verminderten extrazellulären Adenosinkonzentration führen würde, soweit diese nicht durch andere Adenosinquellen kompensiert wird. Es ist bekannt, dass das hier verwendete CD73-defiziente Mausmodell eine erhöhte Aktivität der intrazellulären alkalischen Phosphatase aufweist (Castrop, Huang et al. 2004). Die alkalische Phosphatase besitzt, wie CD73, die Funktion zur Dephosphorylierung von AMP zu Adenosin und könnte deshalb die fehlende enzymatische Funktion der Ekto-5'-Nukleotidase ausgleichen und dadurch einer vom WT abweichenden Adenosinkonzentration vorbeugen. Die mRNA Expressionslevel der Adenosinrezeptoren AR-A1, -A2a, -A2b und -A3 zeigten in den vorliegenden Untersuchungen keine Unterschiede zwischen fibrotischen CD73-KO und WT Nieren. Diese scheinen folglich nicht reguliert zu sein. Um die Frage nach der genauen Wirkung von CD73 auf die renale Fibrogenese zu klären, ist es daher wichtig Aufschluss darüber zu erhalten, ob in CD73-defizienten Mäusen eine veränderte renale Adenosinkonzentration vorliegt und dies der Grund für eine vom WT abweichende Fibrogenese ist.

Ein weiterer möglicher Mechanismus der CD73-Wirkung könnte eine Interaktion mit zirkulierenden Zellen des Immunsystems sein, die durch den Kontakt mit CD73 aktiviert werden könnten. Während der Fibrogenese werden verschiedene ortsständige und infiltrierende Zellen angelockt und zur Differenzierung zu ECM-produzierenden Zellsubtypen angeregt. Hierbei spielen vor allem spezifische Zytokine eine Rolle, die durch die Entzündung im Gewebe vermehrt abgegeben werden und Einfluss auf die Zellaktivierung und Rekrutierung nehmen. Die zentralen Zelltypen sind dabei vor allem Fibroblasten, Myofibroblasten und Fibrozyten, die nach Aktivierung ECM produzieren und folglich die Haupteffektoren der Fibrogenese darstellen.

Um zu testen, ob CD73 hierbei eine zellregulatorische Wirkung ausübt, wurden mRNA Expressionen unterschiedlicher zellspezifischer Oberflächenproteine und Zytokine bestimmt. Ein wichtiger, während der Fibrogenese ausgeschütteter Mediator ist das CCL5/RANTES. Dieser von T-Lymphozyten abgegebene Faktor dient als Lockstoff für Leukozyten, um diese zur Einwanderung in entzündetes Gewebe zu stimulieren. Für CCL5 wurde in fibrotischen CD73-defizienten Nieren eine geringere mRNA Expression als in fibrotischen WT Nieren gefunden. Dies

zeigt, dass ein von CD73-KO Nieren ausgehender niedrigerer Entzündungsreiz auch eine verringerte Zellrekrutierung hervorruft. Auch für das Monozyten-chemotaktische-Protein-1 (MCP-1), sowie für das Fibroblasten-spezifische-Protein-1 (FSP-1) wurden im fibrotischen CD73-KO geringere mRNA-Level als im WT Nierengewebe festgestellt. Dies lässt darauf schließen, dass CD73 die Aktivierung verschiedener Zelltypen und die Produktion und Freisetzung zellspezifischer Lockstoffe beeinflusst. Für CD73 wurde bereits beschrieben, dass es im Zusammenhang mit der Aktivierung von Zellen, wie T-Lymphozyten, oder als Adhäsionsvermittler zwischen T-Zellen und Endothelien steht (Airas, Hellman et al. 1995). Es ist bekannt, dass CD73 direkte Kontakte mit Bestandteilen der ECM, wie Fibronectin, ausbilden kann und somit die Migration und Adhäsion von Zellen beeinflussen kann (Stochaj, Dieckhoff et al. 1989). Eine Wirkung von CD73 auf die Migration von zirkulierenden Zellen des Immunsystems wurde bereits für hepatische Sternzellen festgestellt, die CD73-abhängig vermehrt in das entzündete Lebergewebe einwandern (Andrade, Lopez et al. 2011). Um Zellen zur Migration zu stimulieren, muss vor allem Einfluss auf das kontraktile Zytoskelett der Zellen und deren Kontakt mit der ECM genommen werden. Für CD73 ist die progressive Wirkung auf Aktin und Collagenfasern bereits nachgewiesen worden. Somit könnte CD73 auch die Zellmigration in das fibrotische Nierengewebe anregen.

In der Fibroseentwicklung werden vor allem Leukozyten, wie T-Lymphozyten und Monozyten in das erkrankte Gewebe geleitet, um dem Fortschreiten des Entzündungsprozesses regulatorisch, durch das Ausschütten antifibrotischer Zytokine bzw. durch Phagozytose apoptotischer und nekrotischer Zellen, entgegenzuwirken. Im chronischen Verlauf werden jedoch neben ortsständigen Zellen auch zirkulierende Leukozyten, wie Fibrozyten zur Produktion von ECM angeregt, was die Fibrogenese verstärkt (Wada, Sakai et al. 2007). Um aufzuklären, welche Beteiligung CD73 an der Aktivierung fibrotischer Zellen hat, wurden per Durchflusszytometrie die Zellzahlen verschiedener Leukozyten-subpopulationen in fibrotischen Nieren aus CD73-KO und WT Mäusen bestimmt. Für die Anzahl an Gr⁺, Gr-Monozyten, Granulozyten, B-Lymphozyten, CD4⁺ T-Lymphozyten, CD8⁺ T-Lymphozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen), sowie für F4/80⁺ Makrophagen wurden keine Unterschiede zwischen CD73-KO und

WT Nieren gefunden. Jedoch war die Anzahl von CD11b+/Col I+ Fibrozyten in CD73-defizienten, fibrotischen Nieren, im Vergleich zu WT Nieren, reduziert. Fibrozyten produzieren, wie Fibroblasten, Collagen und tragen somit zur vermehrten Ablagerung an ECM während der Fibrogenese bei. Die bisherige Theorie zur Entstehung von Fibrozyten besagt, dass sich diese aus Monozyten-Vorläuferzellen entwickeln (Niedermeier, Reich et al. 2009). Daraus kann geschlossen werden, dass CD73 die Differenzierung von Monozyten in fibrotisch aktive Fibrozyten beeinflusst. Um diesen Sachverhalt zu prüfen, wurden Zellkulturversuche mit CD73-defizienten und WT Monozyten durchgeführt. Monozyten differenzieren sich in Anwesenheit von aktivierten CD4+ T-Lymphozyten zu collagenpositiven Fibrozyten (Niedermeier, Reich et al. 2009). Dieser Sachverhalt wurde genutzt, um zu testen, ob sich durch CD4+ T-Zellen stimulierte Monozyten in Abhängigkeit einer CD73-Expression entwickeln. Monozyten, die aus Milzen von CD73-KO Tieren isoliert waren, differenzierten sich dabei zu einer geringeren Anzahl zu Fibrozyten als Monozyten, die ihren Ursprung in WT Mäusen hatten. Die verringerte Fibrozytenzahl in CD73-negativen Monozytenkulturen ging dabei mit einer verminderten Produktion und Sezernierung an Collagen I einher. Demzufolge ist eine CD73-Expression für die Differenzierung von Monozyten zu Fibrozyten wichtig und daher für eine vermehrte Produktion von Collagen durch aktivierte Fibrozyten verantwortlich. Dieser Befund könnte ebenfalls dafür genutzt werden, eine Anti-CD73 Therapie zu entwickeln, um einer vermehrten ECM-Bildung vorzubeugen.

Dem genauen Mechanismus dieses Differenzierungseffekts von CD73 auf Monozyten könnte sowohl eine Wirkung von CD73 als Mediator von zellulären Kontakten, als auch eine veränderte Adenosinkonzentration, durch die enzymatische Aktivität von CD73, zu Grunde liegen. Um zu testen, ob eine erhöhte Adenosinkonzentration, durch den Umsatz von AMP durch CD73, eine Rolle bei dieser Zellaktivierung spielen könnte, wurde das Experiment mit verschiedenen Mediumskonzentrationen an AMP wiederholt. Dabei konnten keine Unterschiede in der Collagenproduktion durch stimulierte Monozyten festgestellt werden. Somit wurde bestätigt, dass ein vermehrtes Substratangebot, welches zu einer erhöhten Adenosinproduktion führen sollte, keinen Einfluss auf die Differenzierung von Monozyten zu Fibrozyten besaß. Dies stützt die Theorie, eines nicht-enzymatischen Wirkungsmechanismus von CD73.

Um zu prüfen, ob die Wirkung von CD73 auf die Ausbreitung einer renalen Fibrose auf zirkulierende hämatopoetische oder ortsständige renale Zellpopulationen begrenzt ist, wurden *in vivo* Versuche durchgeführt, bei denen hämatopoetische Stammzellen (hSZ) von CD73-KO und WT Mäusen durch jeweils CD73 positive oder negative hSZ ersetzt wurden. Dazu wurden die Tiere zunächst einer letalen Gammastrahlung ausgesetzt, wodurch ein Gewebeschaden der hämatopoetischen Knochenmarksstammzellen ausgelöst wurde. Darauffolgend wurden den Tieren hSZ, isoliert aus CD73-KO oder WT Knochenmark, transplantiert. Nach acht Wochen Regenerationszeit wurden in den Versuchstieren durch UUOs eine renale Fibrose induziert und die Nieren nach sieben Tagen für weitere Versuche entnommen.

Zunächst wurde die CD73 mRNA Expression im fibrotischen und contralateralen Nierengewebe bestimmt. Hierbei wurden in beiden WT-Gruppen, die mit CD73-WT-SZ oder KO-SZ transplantiert waren ähnliche CD73 mRNA Level festgestellt, die ebenfalls beide im Vergleich zu den contralateralen Kontrollnieren deutlich induziert vorlagen. Der Vergleich der contralateralen Nieren zeigte jedoch, dass die CD73-Expression im CD73-WT/KO-SZ Typ tatsächlich niedriger war als im vollständigen WT. In Nieren von CD73-KO/KO-SZ Tieren konnte keine CD73-Expression nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu, war im CD73-KO, welcher transferierte CD73-WT hSZ enthielt, eine CD73 mRNA Expression messbar. Dabei war das CD73 Level in den fibrotischen Nieren gegenüber den contralateralen Organen erhöht. Dieses Ergebnis ist ein Beweis dafür, dass eine Ausdifferenzierung der CD73-positiven SZ zu reifen hämatopoetischen Zellen in den CD73-KO Mäusen erfolgreich war und diese in das Nierengewebe eingewandert sind. Außerdem wurde auch im CD73-KO/WT-SZ Typ die CD73 mRNA Expression nach UUO, wie es bereits für fibrotische WT-Nieren gezeigt wurde, hochreguliert. Das CD73 mRNA Level war jedoch auch in fibrotischen Nieren von CD73-KO/WT-SZ Mäusen deutlich geringer als in den fibrotischen WT-Gruppen.

Um den Status an renaler Fibrose zu bestimmen, wurde das Nierengewebe auf weitere fibrotische Marker untersucht. mRNA Expressionen der ECM-Moleküle, α SMA, Fibronectin und der Collagene I und III, zeigten dabei ähnliche Level in fibrotischen Nieren aus CD73-WT/WT-SZ, CD73-WT/KO-SZ und CD73-KO/WT-SZ Versuchsgruppen. Dabei wurde eine verminderte mRNA Expression der

ECM-Gene in fibrotischen Nieren von CD73-KO Mäusen, die WT-Stammzellen erhalten hatten, beobachtet. Dieses Ergebnis konnte auch auf Proteinebene für α SMA, Fibronectin und Gesamtcollagen bestätigt werden. Dieser Befund spricht dafür, dass eine geringe Expression von CD73 auf hämatopoetischen Zellen im KO für die Entwicklung einer renalen Fibrose, wie sie im WT festgestellt wurde, ausreichend ist. Ortsständige CD73-defiziente Nierenzellen sind somit in Abwesenheit infiltrierender CD73-positiver Zellen vor einer Fibrogenese geschützt. CD73-defiziente hSZ sind jedoch nicht ausreichend, um in WT-Mäusen die Entwicklung einer renalen Fibrose zu verhindern.

Das mRNA Expressionsprofil für TGF- β zeigte für beide CD73-KO Gruppen verringerte Werte im Vergleich zu den beiden WT-Gruppen. Jedoch war das TGF- β mRNA Expressionslevel in fibrotischen Nieren des CD73-KO/WT-SZ Typs im Bezug auf die CD73-KO/KO-SZ Gruppe erhöht. Die geringere mRNA Expression des zentralen Fibrosemmediators TGF- β könnte somit im CD73-KO/KO-SZ Typ für die verringerte Produktion an ECM verantwortlich sein.

Zuletzt wurden die mRNA Expressionen spezifischer zellulärer Markergene, wie FSP-1 und MCP-1 bestimmt. Hierbei konnte in fibrotischen Nieren aller vier Versuchsgruppen kein Unterschied in der MCP-1 Expression, jedoch in der Expression von FSP-1 festgestellt werden. Parallel zu den Ergebnissen der ECM-Gene und zu TGF- β , wurde in fibrotischen Nieren aus CD73-KO/KO-SZ Tieren ein geringeres FSP-1 mRNA Level gemessen, als in den drei restlichen Gruppen. Da Fibroblasten die Hauptquelle der Produktion von ECM-Fasern, wie dem α SMA, zu sein scheinen, spricht auch dieses Ergebnis dafür, dass ein verminderter Gehalt an Fibroblastenmarker, welcher für einen verminderter Gehalt an Fibroblasten spricht, zu einer erniedrigten Produktion an ECM führt. Um die Transplantationsversuche zu bewerten, kann folglich postuliert werden, dass eine CD73-abhängige Fibroseentwicklung nicht davon abhängt auf welchem Zelltyp die Nukleotidase exprimiert ist und sie ebenfalls nicht vom CD73 mRNA Expressionsniveau beeinflusst ist. Eine CD73 Expression auf zirkulierenden hämatopoetischen Zellen führt im selben Maß zur Ausbildung einer renalen Fibrose, wie eine ortsständige Nierenexpression. Es bleibt zu klären, ob dieser Sachverhalt auf einer veränderten Adenosinkonzentration durch CD73 beruht oder ob er durch zelluläre Mechanismen vermittelt ist.

Es kann festgehalten werden, dass CD73 in jedem Fall eine bedeutende Rolle innerhalb der Aktivierung spezifischer Zelltypen, wie Fibrozyten, zur Produktion von ECM spielt. Der Einfluss von CD73 auf die Fibroseentwicklung reicht dabei soweit, dass eine CD73-Defizienz die Nierenfunktion des fibrotischen Organs schützen kann. Des Weiteren ist es unerheblich auf welcher Zellpopulation CD73 exprimiert wird, um die Fibrogenese zu stimulieren. CD73 sollte deshalb als ein bedeutender Mediator der renalen Fibrogenese betrachtet werden.

6. Ausblick

Durch die hier ausgeführten Experimente konnte nachgewiesen werden, dass CD73 ein möglicher Vermittler der Fibrogenese ist. Die Ergebnisse der Versuche an CD73-defizienten Mäusen zeigten eine verbesserte renale Funktion und eine verminderte Gewebeschädigung in fibrotischen Nieren und beweisen somit, dass das vollständige Fehlen von CD73 einen antifibrotischen Effekt auslöst. Deshalb wären Untersuchungen zur pharmakologischen Modulation der CD73 Aktivität nötig, um zu testen, ob CD73 ein Ziel in der Fibrosetherapie darstellen könnte. Diesbezügliche Experimente könnten die Fibroseentwicklung während einer blockierten CD73-Aktivität, z.B. durch geeignete pharmakologische Hemmstoffe oder während einer verminderten CD73-Expression, z.B. durch siRNA Therapie, bestimmen. Derzeit sind die Möglichkeiten einer pharmakologischen Beeinflussung von CD73 *in vivo* jedoch beschränkt.

7. Zusammenfassung

Renale Fibrose entwickelt sich aufgrund einer Verletzung im Nierengewebe und geht mit einer fortschreitenden Verminderung der Nierenfunktion einher. In Organen wie Haut, Lunge und Leber wurde gezeigt, dass die Ekto-5'-Nukleotidase CD73 Einfluss auf die Entstehung einer Fibrose nimmt. In der hier durchgeführten Studie sollte daher eine mögliche Rolle von CD73 bei der Entwicklung einer Nierenfibrose durch eine Untersuchung eines CD73-defizienten Mausmodells bestimmt werden.

Im Vergleich von fibrotischem CD73-KO und WT Nierengewebe wurden im KO niedrigere mRNA und Proteinexpressionen fibrotischer Marker, wie α SMA, Fibronectin, sowie Collagen I und III gefunden. Auch die Expressionen fibrotischer Mediatoren, wie TGF- β , IFN- γ oder IL-6 waren im CD73-KO verringert.

Um zu bestimmen, ob dieser verminderte Fibrosefortschritt auch in Zusammenhang mit einer verbesserten Nierenfunktion steht, wurden glomeruläre Filtrationsraten nach Durchführung einer reversiblen UUO (RUUO) gemessen. Die GFR von CD73-KO Mäusen verringerte sich nach RUUO dabei um 30%, wobei die GFR von fibrotischen WT Mäusen um 82% der Basis-GFR von unbehandelten Mäusen sank. Somit war die Nierenfunktion im CD73-KO partiell geschützt.

Durch FACS-Analysen wurden des Weiteren Unterschiede bzgl. fibrotischer Zellspezies zwischen CD73-KO und WT gefunden. In Nieren von CD73-defizienten Tieren waren die Zellzahlen von Fibrozyten im Vergleich zu CD73-WT Mäusen verringert, wobei auch die Produktion an Collagen im Nierengewebe erniedrigt war.

Durch Zellkulturversuche konnte belegt werden, dass die Differenzierung von Monozyten zu Fibrozyten, abhängig von der CD73-Expression, jedoch unabhängig von der extrazellulären Adenosinkonzentration war. Dies führte zu der Hypothese, dass dem Einfluss von CD73 auf die Entwicklung einer renalen Fibrose eine nicht-enzymatische, adenosinunabhängige Funktion zu Grunde liegen könnte. Die Transplantation von CD73-exprimierenden hSZ führte im CD73-KO zu einer erhöhten Fibroseentwicklung. Der CD73-Knockout in hSZ von WT Mäusen erzielte jedoch keine Regulation der Fibrogenese. Somit scheint eine generelle,

ortsunabhängige Expression von CD73 für die Vermittlung der renalen Fibrose verantwortlich zu sein.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass CD73 im UUO Modell induziert ist, und dass eine CD73-abhängige Zellstimulation die Ausbildung einer renalen Fibrose anregt. Zusätzlich verringert ein Fehlen von CD73 die Produktion an ECM und verbessert somit die Nierenfunktion. Dieser physiologisch relevante Befund spricht dafür, dass CD73 ein möglicher pharmakologischer Angriffspunkt für die Behandlung einer renalen Fibrose darstellen könnte.

8. Abstract

Renal fibrosis develops upon severe kidney injury and leads to an impaired kidney function. For organs such as the skin, lung and liver it is known that the ecto-5'-nucleotidase CD73 influences the development of renal fibrosis. A possible role of CD73 in the generation of renal fibrosis was determined in the present study. A CD73-deficient mouse model was investigated after induction of renal fibrosis by unilateral ureter obstructions (UUO). In fibrotic CD73-KO kidneys mRNA expression and protein levels of the extracellular matrix molecules α SMA, fibronectin and collagen I and III, were reduced compared to WT kidneys. Further the mRNA expression of fibrotic markers, such as TGF- β , IFN- γ and interleukin-6, were decreased in fibrotic CD73-KO kidneys compared to WT. To determine the effect of CD73 on the renal function of fibrotic kidneys, glomerular filtration rate (GFR) was determined after a reversal of UUO (RUUO). The GFR of CD73-deficient mice was decreased by 30% after RUUO. The GFR of fibrotic WT mice was reduced by 82% of the baseline-GFR of control mice. Consequently, the renal function of CD73-KO mice was partially protected.

FACS-analyses were performed to detect potential differences between fibrotic CD73-KO and WT kidneys, regarding the number of circulating lymphocytes. Fibrotic kidneys of CD73-deficient mice showed lower numbers of fibrocytes than kidneys of WT mice, which was accompanied by lower amounts of secreted collagen I. Cell culture experiments suggested that the differentiation of monocytes into fibrocytes was dependent on the expression of CD73, but was independent of the extracellular adenosine concentration. Consequently, CD73 may promote renal fibrosis in a non-enzymatic and adenosine independent way. The transplantation of CD73-positive hematopoietic stem cells (hSC) into CD73-KO mice led to an increased development of fibrosis. The knock-out of CD73 in hSC of WT mice, however, did not affect fibrogenesis. In conclusion, expression of CD73 on either hSC or local renal cells appears to be crucial for the development of renal fibrosis,

In summary, CD73 is induced in the UUO model and CD73-dependent signaling stimulates the progression of renal fibrosis. CD73 therefore may constitute a possible pharmacological target for the treatment of renal fibrosis.

9. Literaturverzeichnis

- Airas, L., J. Hellman, et al. (1995). "CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73." *J Exp Med* 182(5): 1603-1608.
- Airas, L., J. Niemela, et al. (2000). "CD73 engagement promotes lymphocyte binding to endothelial cells via a lymphocyte function-associated antigen-1-dependent mechanism." *J Immunol* 165(10): 5411-5417.
- Aird, S. D. (2005). "Taxonomic distribution and quantitative analysis of free purine and pyrimidine nucleosides in snake venoms." *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 140(1): 109-126.
- Anderson, C. M., W. Xiong, et al. (1996). "Demonstration of the existence of mRNAs encoding N1/cif and N2/cit sodium/nucleoside cotransporters in rat brain." *Brain Res Mol Brain Res* 42(2): 358-361.
- Andrade, C. M., P. L. Lopez, et al. (2011). "Ecto-5'-nucleotidase/CD73 knockdown increases cell migration and mRNA level of collagen I in a hepatic stellate cell line." *Cell Tissue Res* 344(2): 279-286.
- Aymerich, I., S. Duflot, et al. (2005). "The concentrative nucleoside transporter family (SLC28): new roles beyond salvage?" *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 1): 216-219.
- Baldwin, J. M., G. F. Schertler, et al. (1997). "An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors." *J Mol Biol* 272(1): 144-164.
- Baldwin, S. A., P. R. Beal, et al. (2004). "The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29." *Pflugers Arch* 447(5): 735-743.
- Barnes, J. L. and Y. Gorin (2011). "Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases." *Kidney Int* 79(9): 944-956.
- beltina.org.
- Bianchi, V. and J. Spychala (2003). "Mammalian 5'-nucleotidases." *J Biol Chem* 278(47): 46195-46198.
- Border, W. A. and N. A. Noble (1997). "TGF-beta in kidney fibrosis: a target for gene therapy." *Kidney Int* 51(5): 1388-1396.

- Born, G. V. (1962). "Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal." *Nature* 194: 927-929.
- Boye, K. and G. M. Maelandsmo (2010). "S100A4 and metastasis: a small actor playing many roles." *Am J Pathol* 176(2): 528-535.
- Bucala, R. (2012). "Review Series--Inflammation & Fibrosis. Fibrocytes and fibrosis." *QJM* 105(6): 505-508.
- Bucala, R., L. A. Spiegel, et al. (1994). "Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair." *Mol Med* 1(1): 71-81.
- Burns, W. C. and M. C. Thomas (2010). "The molecular mediators of type 2 epithelial to mesenchymal transition (EMT) and their role in renal pathophysiology." *Expert Rev Mol Med* 12: e17.
- Castrop, H., Y. Huang, et al. (2004). "Impairment of tubuloglomerular feedback regulation of GFR in ecto-5'-nucleotidase/CD73-deficient mice." *J Clin Invest* 114(5): 634-642.
- Chan, E. S., P. Fernandez, et al. (2006). "Adenosine A2A receptors in diffuse dermal fibrosis: pathogenic role in human dermal fibroblasts and in a murine model of scleroderma." *Arthritis Rheum* 54(8): 2632-2642.
- Chan, E. S., M. C. Montesinos, et al. (2006). "Adenosine A(2A) receptors play a role in the pathogenesis of hepatic cirrhosis." *Br J Pharmacol* 148(8): 1144-1155.
- Chesney, J., C. Metz, et al. (1998). "Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes." *J Immunol* 160(1): 419-425.
- Chung, A. C. and H. Y. Lan (2011). "Chemokines in renal injury." *J Am Soc Nephrol* 22(5): 802-809.
- Collins, A. J., R. N. Foley, et al. (2012). "United States Renal Data System 2011 Annual Data Report: Atlas of chronic kidney disease & end-stage renal disease in the United States." *Am J Kidney Dis* 59(1 Suppl 1): A7, e1-420.
- Collins, A. J., R. N. Foley, et al. (2011). "US Renal Data System 2010 Annual Data Report." *Am J Kidney Dis* 57(1 Suppl 1): A8, e1-526.
- Cronstein, B. N. (2011). "Adenosine receptors and fibrosis: a translational review." *F1000 Biol Rep* 3: 21.
- Duffield, J. S. (2010). "Macrophages and immunologic inflammation of the kidney." *Semin Nephrol* 30(3): 234-254.

- Duffield, J. S. and B. D. Humphreys (2011). "Origin of new cells in the adult kidney: results from genetic labeling techniques." *Kidney Int* 79(5): 494-501.
- Eckle, T., L. Fullbier, et al. (2007). "Identification of ectonucleotidases CD39 and CD73 in innate protection during acute lung injury." *J Immunol* 178(12): 8127-8137.
- Eddy, A. A. (2000). "Molecular basis of renal fibrosis." *Pediatr Nephrol* 15(3-4): 290-301.
- Eddy, A. A. (2005). "Progression in chronic kidney disease." *Adv Chronic Kidney Dis* 12(4): 353-365.
- Eknoyan, G., M. A. McDonald, et al. (1990). "Chronic tubulo-interstitial nephritis: correlation between structural and functional findings." *Kidney Int* 38(4): 736-743.
- Eltzschig, H. K., L. F. Thompson, et al. (2004). "Endogenous adenosine produced during hypoxia attenuates neutrophil accumulation: coordination by extracellular nucleotide metabolism." *Blood* 104(13): 3986-3992.
- Erdogan, S., O. Aslantas, et al. (2008). "The effects of increased cAMP content on inflammation, oxidative stress and PDE4 transcripts during *Brucella melitensis* infection." *Res Vet Sci* 84(1): 18-25.
- Fausther, M., N. Sheung, et al. (2012). "Activated hepatic stellate cells upregulate transcription of ecto-5'-nucleotidase/CD73 via specific SP1 and SMAD promoter elements." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 303(8): G904-914.
- Foundation, N. K. (2002). "K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification." *Am J Kidney Dis* 39:Suppl 1:S1-S266.
- Fredholm, B. B., M. P. Abbracchio, et al. (1994). "Nomenclature and classification of purinoceptors." *Pharmacol Rev* 46(2): 143-156.
- Gamba, G. and P. A. Friedman (2009). "Thick ascending limb: the Na(+):K (+):2Cl (-) co-transporter, NKCC2, and the calcium-sensing receptor, CaSR." *Pflugers Arch* 458(1): 61-76.
- Gao, Z., T. Chen, et al. (1999). "A2B adenosine and P2Y2 receptors stimulate mitogen-activated protein kinase in human embryonic kidney-293 cells. cross-talk between cyclic AMP and protein kinase c pathways." *J Biol Chem* 274(9): 5972-5980.

- Gorlach, A. (2005). "Control of adenosine transport by hypoxia." *Circ Res* 97(1): 1-3.
- Grande, M. T. and J. M. Lopez-Novoa (2009). "Fibroblast activation and myofibroblast generation in obstructive nephropathy." *Nat Rev Nephrol* 5(6): 319-328.
- Grgic, I., J. S. Duffield, et al. (2012). "The origin of interstitial myofibroblasts in chronic kidney disease." *Pediatr Nephrol* 27(2): 183-193.
- Grigorian, M., N. Ambartsumian, et al. (2008). "Metastasis-inducing S100A4 protein: implication in non-malignant human pathologies." *Curr Mol Med* 8(6): 492-496.
- Haroun, M. K., B. G. Jaar, et al. (2003). "Risk factors for chronic kidney disease: a prospective study of 23,534 men and women in Washington County, Maryland." *J Am Soc Nephrol* 14(11): 2934-2941.
- Hasko, G., J. Linden, et al. (2008). "Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases." *Nat Rev Drug Discov* 7(9): 759-770.
- Hewitson, T. D. (2009). "Renal tubulointerstitial fibrosis: common but never simple." *Am J Physiol Renal Physiol* 296(6): F1239-1244.
- Hinz, B., S. H. Phan, et al. (2007). "The myofibroblast: one function, multiple origins." *Am J Pathol* 170(6): 1807-1816.
- Huang, D. Y., V. Vallon, et al. (2006). "Ecto-5'-nucleotidase (cd73)-dependent and -independent generation of adenosine participates in the mediation of tubuloglomerular feedback in vivo." *Am J Physiol Renal Physiol* 291(2): F282-288.
- Humphreys, B. D., S. L. Lin, et al. (2010). "Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis." *Am J Pathol* 176(1): 85-97.
- Jalkanen, S. and M. Salmi (2008). "VAP-1 and CD73, endothelial cell surface enzymes in leukocyte extravasation." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(1): 18-26.
- Kaissling, B. and M. Le Hir (2008). "The renal cortical interstitium: morphological and functional aspects." *Histochem Cell Biol* 130(2): 247-262.
- Kelly, K. J., J. L. Burford, et al. (2009). "Postischemic inflammatory syndrome: a critical mechanism of progression in diabetic nephropathy." *Am J Physiol Renal Physiol* 297(4): F923-931.

- Klahr, S. and J. Morrissey (2002). "Obstructive nephropathy and renal fibrosis." *Am J Physiol Renal Physiol* 283(5): F861-875.
- Klinke R., S. S. (2005). "Lehrbuch der Physiologie."
- Koszalka, P., B. Ozuyaman, et al. (2004). "Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response." *Circ Res* 95(8): 814-821.
- Kriz, W., B. Kaissling, et al. (2011). "Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy?" *J Clin Invest* 121(2): 468-474.
- Lasley, R. D., J. O. Hegge, et al. (1998). "Comparison of interstitial fluid and coronary venous adenosine levels in in vivo porcine myocardium." *J Mol Cell Cardiol* 30(6): 1137-1147.
- Le Hir, M. and B. Kaissling (1993). "Distribution and regulation of renal ecto-5'-nucleotidase: implications for physiological functions of adenosine." *Am J Physiol* 264(3 Pt 2): F377-387.
- Leibovich, S. J., J. F. Chen, et al. (2002). "Synergistic up-regulation of vascular endothelial growth factor expression in murine macrophages by adenosine A(2A) receptor agonists and endotoxin." *Am J Pathol* 160(6): 2231-2244.
- Li, J. and J. F. Bertram (2010). "Review: Endothelial-myofibroblast transition, a new player in diabetic renal fibrosis." *Nephrology (Carlton)* 15(5): 507-512.
- Linden, J. (2001). "Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41: 775-787.
- Linden, J., T. Thai, et al. (1999). "Characterization of human A(2B) adenosine receptors: radioligand binding, western blotting, and coupling to G(q) in human embryonic kidney 293 cells and HMC-1 mast cells." *Mol Pharmacol* 56(4): 705-713.
- Liu, Y. (2006). "Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics." *Kidney Int* 69(2): 213-217.
- Liu, Y. (2010). "New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis." *J Am Soc Nephrol* 21(2): 212-222.
- Liu, Y. (2011). "Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis." *Nat Rev Nephrol* 7(12): 684-696.
- Louis, N. A., A. M. Robinson, et al. (2008). "Control of IFN-alphaA by CD73: implications for mucosal inflammation." *J Immunol* 180(6): 4246-4255.

- MacLean, D. A., L. M. Vickery, et al. (2001). "Elevated interstitial adenosine concentrations do not activate the muscle reflex." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280(2): H546-553.
- Meran, S. and R. Steadman (2011). "Fibroblasts and myofibroblasts in renal fibrosis." *Int J Exp Pathol* 92(3): 158-167.
- Mlodzik, K., J. Loffing, et al. (1995). "Ecto-5'-nucleotidase is expressed by pericytes and fibroblasts in the rat heart." *Histochem Cell Biol* 103(3): 227-236.
- Nathan, C. and A. Ding (2010). "Nonresolving inflammation." *Cell* 140(6): 871-882.
- Niedermeier, M., B. Reich, et al. (2009). "CD4+ T cells control the differentiation of Gr1+ monocytes into fibrocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(42): 17892-17897.
- Noji, T., M. Takayama, et al. (2002). "KF24345, an adenosine uptake inhibitor, suppresses lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α production and leukopenia via endogenous adenosine in mice." *J Pharmacol Exp Ther* 300(1): 200-205.
- Okusa, M. D., J. Linden, et al. (1999). "Selective A2A adenosine receptor activation reduces ischemia-reperfusion injury in rat kidney." *Am J Physiol* 277(3 Pt 2): F404-412.
- Olah, M. E. (1997). "Identification of A2a adenosine receptor domains involved in selective coupling to Gs. Analysis of chimeric A1/A2a adenosine receptors." *J Biol Chem* 272(1): 337-344.
- Palmer, T. M., J. L. Benovic, et al. (1995). "Agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the rat A3 adenosine receptor. Evidence for a G-protein-coupled receptor kinase-mediated mechanism." *J Biol Chem* 270(49): 29607-29613.
- Palmer, T. M., T. W. Gettys, et al. (1995). "Differential interaction with and regulation of multiple G-proteins by the rat A3 adenosine receptor." *J Biol Chem* 270(28): 16895-16902.
- Peng, Z., P. Fernandez, et al. (2008). "Ecto-5'-nucleotidase (CD73) -mediated extracellular adenosine production plays a critical role in hepatic fibrosis." *FASEB J* 22(7): 2263-2272.

- Pierce, K. D., T. J. Furlong, et al. (1992). "Molecular cloning and expression of an adenosine A2b receptor from human brain." *Biochem Biophys Res Commun* 187(1): 86-93.
- Pinhal-Enfield, G., M. Ramanathan, et al. (2003). "An angiogenic switch in macrophages involving synergy between Toll-like receptors 2, 4, 7, and 9 and adenosine A(2A) receptors." *Am J Pathol* 163(2): 711-721.
- Quaggin, S. E. and A. Kapus (2011). "Scar wars: mapping the fate of epithelial-mesenchymal-myofibroblast transition." *Kidney Int* 80(1): 41-50.
- Regateiro, F. S., S. P. Cobbold, et al. (2013). "CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments." *Clin Exp Immunol* 171(1): 1-7.
- Regateiro, F. S., D. Howie, et al. (2011). "Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF-beta." *Eur J Immunol* 41(10): 2955-2965.
- Resta, R., S. W. Hooker, et al. (1997). "Insights into thymic purine metabolism and adenosine deaminase deficiency revealed by transgenic mice overexpressing ecto-5'-nucleotidase (CD73)." *J Clin Invest* 99(4): 676-683.
- Resta, R. and L. F. Thompson (1997). "T cell signalling through CD73." *Cell Signal* 9(2): 131-139.
- Ricardo, S. D., H. van Goor, et al. (2008). "Macrophage diversity in renal injury and repair." *J Clin Invest* 118(11): 3522-3530.
- Romio, M. (2010). "Die Rolle der ekto-5'-Nukleotidase (CD73) und des Adenosin A2A Rezeptors bei der Immunmodulation." Deutsche Nationalbibliothek.
- Sarnak MJ, L. A., Schoolwerth AC, et al. (2003). "Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention." *Hypertension* 42:1050-1065.
- Schieppati, A. and G. Remuzzi (2005). "Chronic renal diseases as a public health problem: epidemiology, social, and economic implications." *Kidney Int Suppl*(98): S7-S10.

- Schneider, D. J., J. C. Lindsay, et al. (2010). "Adenosine and osteopontin contribute to the development of chronic obstructive pulmonary disease." *FASEB J* 24(1): 70-80.
- Schreiber, R., H. Castrop, et al. (2008). "Allergen-induced airway hyperresponsiveness is absent in ecto-5'-nucleotidase (CD73)-deficient mice." *Pflügers Arch* 457(2): 431-440.
- Schrimpf, C. and J. S. Duffield (2011). "Mechanisms of fibrosis: the role of the pericyte." *Curr Opin Nephrol Hypertens* 20(3): 297-305.
- Schroder, K. and J. Tschopp (2010). "The inflammasomes." *Cell* 140(6): 821-832.
- Schulte, G. (2004). "Adenosin, Adenosinrezeptoren und adenosinrezeptoraktivierte Signalwege." *BIOspektrum* 10: 159-161.
- Siaghy, E. M., Y. Devaux, et al. (2000). "Consequences of inspired oxygen fraction manipulation on myocardial oxygen pressure, adenosine and lactate concentrations: a combined myocardial microdialysis and sensitive oxygen electrode study in pigs." *J Mol Cell Cardiol* 32(3): 493-504.
- Snyder, F. F. and J. F. Henderson (1973). "Alternative pathways of deoxyadenosine and adenosine metabolism." *J Biol Chem* 248(16): 5899-5904.
- Sparks, H. V., Jr. and H. Bardenheuer (1986). "Regulation of adenosine formation by the heart." *Circ Res* 58(2): 193-201.
- Stagg, J., U. Divisekera, et al. (2011). "CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis." *Cancer Res* 71(8): 2892-2900.
- Stagg, J., U. Divisekera, et al. (2010). "Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(4): 1547-1552.
- Stevens L.A., C. J., Greene T., Levey A.S. (2006). "Assessing Kidney Function — Measured and Estimated Glomerular Filtration Rate." *N Engl J Med* 354:2473-2483.
- Stochaj, U., J. Dieckhoff, et al. (1989). "Evidence for the direct interaction of chicken gizzard 5'-nucleotidase with laminin and fibronectin." *Biochim Biophys Acta* 992(3): 385-392.
- Strutz, F. and M. Zeisberg (2006). "Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease." *J Am Soc Nephrol* 17(11): 2992-2998.

- Synnestvedt, K., G. T. Furuta, et al. (2002). "Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia." *J Clin Invest* 110(7): 993-1002.
- Szabo, C. and P. Pacher (2012). "The outsiders: emerging roles of ectonucleotidases in inflammation." *Sci Transl Med* 4(146): 146ps114.
- Thompson, L. F., H. K. Eltzschig, et al. (2004). "Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia." *J Exp Med* 200(11): 1395-1405.
- Thompson, L. F., J. M. Ruedi, et al. (1986). "Ecto-5'-nucleotidase expression during human B cell development. An explanation for the heterogeneity in B lymphocyte ecto-5'-nucleotidase activity in patients with hypogammaglobulinemia." *J Immunol* 137(8): 2496-2500.
- Traut, T. W. (1994). "Physiological concentrations of purines and pyrimidines." *Mol Cell Biochem* 140(1): 1-22.
- Vallon, V., B. Muhlbauer, et al. (2006). "Adenosine and kidney function." *Physiol Rev* 86(3): 901-940.
- Venkatachalam, M. A., K. A. Griffin, et al. (2010). "Acute kidney injury: a springboard for progression in chronic kidney disease." *Am J Physiol Renal Physiol* 298(5): F1078-1094.
- Vernon, M. A., K. J. Mylonas, et al. (2010). "Macrophages and renal fibrosis." *Semin Nephrol* 30(3): 302-317.
- Vielhauer, V., O. Kulkarni, et al. (2010). "Targeting the recruitment of monocytes and macrophages in renal disease." *Semin Nephrol* 30(3): 318-333.
- Volmer, J. B., L. F. Thompson, et al. (2006). "Ecto-5'-nucleotidase (CD73)-mediated adenosine production is tissue protective in a model of bleomycin-induced lung injury." *J Immunol* 176(7): 4449-4458.
- Wada, T., N. Sakai, et al. (2007). "Fibrocytes: a new insight into kidney fibrosis." *Kidney Int* 72(3): 269-273.
- Wang, L., J. Fan, et al. (2011). "CD73 has distinct roles in nonhematopoietic and hematopoietic cells to promote tumor growth in mice." *J Clin Invest* 121(6): 2371-2382.
- Williams, T. C. and S. M. Jarvis (1991). "Multiple sodium-dependent nucleoside transport systems in bovine renal brush-border membrane vesicles." *Biochem J* 274 (Pt 1): 27-33.

- Wynn, T. A. (2007). "Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases." *J Clin Invest* 117(3): 524-529.
- Yang, J. and Y. Liu (2001). "Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis." *Am J Pathol* 159(4): 1465-1475.
- Yang, L., T. Y. Besschetnova, et al. (2010). "Epithelial cell cycle arrest in G2/M mediates kidney fibrosis after injury." *Nat Med* 16(5): 535-543, 531p following 143.
- Zeisberg, M. and J. S. Duffield (2010). "Resolved: EMT produces fibroblasts in the kidney." *J Am Soc Nephrol* 21(8): 1247-1253.
- Zeisberg, M. and E. G. Neilson (2010). "Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis." *J Am Soc Nephrol* 21(11): 1819-1834.
- Zernecke, A., K. Bidzhekov, et al. (2006). "CD73/ecto-5'-nucleotidase protects against vascular inflammation and neointima formation." *Circulation* 113(17): 2120-2127.
- Zimmermann, H. (1992). "5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects." *Biochem J* 285 (Pt 2): 345-365.

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Aufbau des Nephrons
- Abbildung 2:** Metabolismus des extrazellulären Adenosins
- Abbildung 3:** Auf- und Abbaukaskade des Adenosins
- Abbildung 4:** Adenosinrezeptoren und ihre Signalwege
- Abbildung 5:** 4 Phasen der Fibrogenese
- Abbildung 6:** Vermittlung zellulärer Ereignisse während der Fibrogenese
- Abbildung 7:** mögliche Vorläuferzellen der EZM-produzierenden Zellen
- Abbildung 8:** Schema zur Induktion einer renalen Fibrose durch UUO
- Abbildung 9:** Versuchsschema der reversiblen UUO (RUUO)
- Abbildung 10:** Schema zum Versuchsablauf bzgl. der Knochenmarkszelltransplantation
- Abbildung 11:** CD73 mRNA-Gehalt in fibrotischen und contralateralen Nieren von WT Mäusen 7 Tage nach UUO
- Abbildung 12:** CD73 Proteingehalt in fibrotischen und contralateralen Nieren von WT Mäusen 7 Tage nach UUO
- Abbildung 13:** mRNA Expression extrazellulärer-Matrix-Proteine, α SMA, Fibronektin und Collagen 1a1, 1a2 und 3a1 in fibrotischen und contralateralen Kontrollnieren von CD73-KO und WT Mäusen.
- Abbildung 14:** mRNA Expression fibrotischer Markerproteine und fibrotischer Zytokine in fibrotischen und contralateralen Kontrollnieren von CD73-KO und WT Mäusen.
- Abbildung 15:** mRNA Expression der Adenosinrezeptoren AR-A1, -A2a, -A2b und -A3 in fibrotischen und contralateralen Kontrollnieren von CD73-KO und WT Mäusen.
- Abbildung 16:** Westernblot gegen α SMA, detektiert in 30 μ g Gesamtproteinextrakt, isoliert aus CD73-KO und WT Nierengewebe 7 Tage nach UUO (n=5).

- Abbildung 17:** Westernblot gegen Fibronectin, detektiert in 50 ug Gesamtproteinextrakt, isoliert aus CD73-KO und WT Nierengewebe 7 Tage nach UUO (n=5).
- Abbildung 18:** IHC-Färbungen gegen α SMA in paraffin-fixiertem fibrotischen und Kontrollnierengewebe von CD73-KO und WT Mäusen.
- Abbildung 19:** IHC-Färbungen gegen Fibronectin in paraffin-fixiertem fibrotischen und Kontrollnierengewebe von CD73-KO und WT Mäusen.
- Abbildung 20:** Sirius Red und Fast Green Färbung von Gesamt-collagenfasern (rot) und Restprotein (grün) in paraffin-fixiertem Nierengewebe von CD73-KO und WT Mäusen. Verglichen wurden Kontrollnierenschnitte mit fibrotischem Nierengewebe 7 Tage nach UUO.
- Abbildung 21:** GFR-Messungen vor und nach reversibler UUO in CD73-KO und WT Mäusen. Untere Abbildung zeigt GFR-Werte im Bezug auf das Körpergewicht.
- Abbildung 22:** FACS-Analyse der Anzahl von Leukozyten in fibrotischem CD73-KO und WT Nierengewebe.
- Abbildung 23:** FACS-Analyse der Anzahl von Makrophagen und Fibrozyten in fibrotischem CD73-KO und WT Nierengewebe.
- Abbildung 24:** Fibrozytenanzahl nach Co-Inkubation von CD73+ und CD73-Monozyten und CD4+ T-Lymphozyten, isoliert aus Milzen von CD73-WT oder -KO Mäusen.
- Abbildung 25:** Ergebnisse eines Collagen I ELISA: Gehalt an extrazellulärem Collagen I nach Co-Inkubation von CD73+ und CD73-Monozyten und CD4+ T-Lymphozyten, isoliert aus Milzen von CD73-WT oder -KO Mäusen.
- Abbildung 26:** Ergebnisse eines Collagen I ELISA: Gehalt an extrazellulärem Collagen I nach Co-Inkubation von CD73+ und CD73-Monozyten und CD4+ T-Lymphozyten, isoliert aus Milzen von

CD73-WT oder -KO Mäusen im Abhängigkeit der AMP-Konzentration im Medium.

- Abbildung 27:** CD73 mRNA Expression in fibrotischen und contralateralen Nieren von CD73-KO und WT Mäusen, transferiert mit CD73-KO oder WT hSZ.
- Abbildung 28:** mRNA Expressionen der ECM-Moleküle α SMA, Fibronectin und der Collagene 1a1, 1a2, 3a1 in fibrotischen und contralateralen Kontrollnieren von CD73-KO und WT Mäusen, transferiert mit CD73-KO oder WT hSZ.
- Abbildung 29:** Proteingehalt an α SMA pro Nierengewebeschnitt (%) aus fibrotischen und contralateralen Kontrollnieren von CD73-KO und WT Mäusen, transferiert mit CD73-KO oder WT hSZ. Nierenschnitte wurden aus cryopreserviertem Nierengewebe hergestellt. α SMA-Proteine wurden immunohistochemisch mit primären Maus-anti- α SMA und sekundären anti-Maus-Cy2 Antikörpern detektiert. Anschließend wurde mittels der Software Metamorph der Gehalt an α SMA quantifiziert.
- Abbildung 30:** Proteingehalt an Fibronectin pro Nierengewebeschnitt (%) aus fibrotischen und contralateralen Kontrollnieren von CD73-KO und WT Mäusen, transferiert mit CD73-KO oder WT hSZ. Nierenschnitte wurden aus cryopreserviertem Nierengewebe hergestellt. Fibronectinproteine wurden immunohistochemisch mit primären Kaninchen-anti-Fibronectin und sekundären anti-Kaninchen-Tritc Antikörpern detektiert. Anschließend wurde mittels der Software Metamorph der Gehalt an Fibronectin quantifiziert.
- Abbildung 31:** Proteingehalt an Gesamtcollagen in Bezug auf den Gehalt an Restprotein pro Nierengewebeschnitt aus fibrotischen und contralateralen Kontrollnieren von CD73-KO und WT Mäusen, transferiert mit CD73-KO oder WT hSZ. Nierenschnitte wurden aus cryopreserviertem Nierengewebe hergestellt.

Collagene und Restproteine wurden mittels einer Sirius Red und Fast Green Färbung detektiert. Anschließend wurde der Proteingehalt in den Nierengewebeschnitten mittels der Software Metamorph quantifiziert.

Abbildung 32: mRNA Expressionen von TGF- β , in fibrotischen und contralateralen Kontrollnieren von CD73-KO und WT Mäusen, transferiert mit CD73-KO oder WT hSZ.

Abbildung 33: mRNA Expressionen der zellspezifischen Markergene FSP-1 und MCP-1 in fibrotischen und contralateralen Kontrollnieren von CD73-KO und WT Mäusen, transferiert mit CD73-KO oder WT hSZ.

Abkürzungsverzeichnis

+/+	homozygot exprimierte Allele
-/-	homozygoter Gen-Knockout
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
α SMA	alpha smooth muscle actin/ alpha glattes Muskel-Aktin
AMP	Adenosin-Monophosphat
APCP	α β -Methylen ADP
AR-A1	Adenosinrezeptor A1
AR-A2a	Adenosinrezeptor A2a
AR-A2b	Adenosinrezeptor A2b
AR-A3	Adenosinrezeptor A3
ATP	Adenosin-Triphosphat
BSA	bovine serum albumin
C57BL6	C57 Black 6
Ca ²⁺	Calcium
cAMP	cyklisches AMP
CD39	Ektoapyrase
CD73	Ekto-5' -Nukleotidase
Col I, III	Collagen I, III
d	Tag
ECL	enhanced chemiluminescence
ECM = EZM	extracellular matrix/ extrazelluläre Matrix
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
EndoMT	endotheliale-mesenchymale Transition
Epac	exchange proteins activated by cAMP
EPO	Erythropoietin
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FELASA	the Federation of Laboratory Animal Science Associations
FG	Fast Green

FITC-Sinistrin	Fluorescein Isothiocyanat-Sinistrin
FSP-1	Fibroblasten spezifisches Protein-1
g	Gramm
Gap-DH	Glycerinaldehyd – 3-Phosphat-Dehydrogenase
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes/ GTP-bindendes Protein
GTP	Guanin-Triphosphat
Gy	Gray
h	Stunde
hSZ	hämatopoetische Stammzellen
hSC	hematopoetic stem cells
IFN-γ	Interferon-gamma
IHC	Immunhistochemie
IL-2, -6, -13	Interleukin-2, -6, -13
IMP	Inosin-Monophosphat
KGW	Körpergewicht
KO	Knockout
Kontr.	Kontrolle
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharide
LSM	konfokales Laserscanmikroskop
MACS	magnetic cell sorting
MAPK	mitogenaktivierten Proteinkinaseweg
MCP-1	Monozyten chemotaktisches Protein-1
μg	Microgramm
μM	micromolar
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
MIP	Makrophagen-inflammatorisches-Protein
MMP-2, -13, -14	Matrix-Metallo-Proteinasen -2, -13, -14
mRNA	messenger ribonucleic acid / messenger Ribonukleinsäure

n	Tierzahl
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
nM	nanomolar
ns	nicht significant
p	p-Wert
PLC	Phospholipase C
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RUUO	reversible unilaterale Ureterobstruktion
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
SR	Sirius Red
SZ	Stammzellen
TGF	Tubuloglomeruläres Feedback
TGF- β	transforming growth factor-beta
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
UUO	unilaterale Ureterobstruktion
WT	Wildtyp

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Isabel Anna Carota
Anschrift	Deischgasse 2, 93047 Regensburg
geboren am	12. Juni 1982 in München
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Promotion

03/2010-03/2013 Universität Regensburg, Institut für Physiologie, angeleitet von Herrn Prof. Dr. Hayo Castrop

Promotionstitel: „Untersuchungen zur Rolle der Ecto-5'-Nukleotidase (CD73) in der Entwicklung der renalen Fibrose“

Mitglied der Regensburg International Graduate School of Life Sciences

Kongresse:

- Experimental Biology 2012, San Diego, USA
Vortrag zum Thema: „Role of the Ecto-5'-Nucleotidase in the development of renal fibrosis“
- ASN Kidney Week 2012, San Diego, USA
Poster zum Thema: „Role of the Ecto-5'-Nucleotidase in the development of renal fibrosis“

Berufliche Erfahrung

03/2010-03/2013	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Physiologie, Universität Regensburg
09/2001-07/2003	Ausbildung zur Bauzeichnerin, Architekturwerkstatt Karl Hanke, Regensburg

Studium

10/2003-09/2009 **Studium der Biologie**, Universität Regensburg
Abschluss: Diplom Biologin (Gesamtnote sehr gut)
Hauptfächer: Zellbiologie, Biochemie, Zoologie
Titel der Diplomarbeit: „Funktionale Charakterisierung der verschiedenen Isoformen des renalen NKCC2-Cotransporters“
Veröffentlichung: “Localization and functional characterization of the human NKCC2 isoforms”, Acta Physiologica, 02/2010

Schulbildung

1996-2001 Goethe Gymnasium, Regensburg
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
1992-1996 St. Marien-Gymnasium, Regensburg

Danke

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt dabei Herrn Prof. Dr. Hayo Castrop für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die besondere Förderung, sowie für die hervorragende Betreuung. Die fachliche Beratung und die persönliche Unterstützung waren immer sehr hilfreich und motivierend.

Bei Prof. Dr. Frank Schweda möchte ich mich für die stets sehr guten Anregungen bedanken. Ebenfalls bedanke ich mich bei Prof. Dr. Claus Hellerbrand für die Begutachtung meiner Arbeit, sowie bei den weiteren Mitgliedern meiner Prüfungskommission, Prof. Dr. Richard Warth und Prof. Dr. Dr. Michael Krahn.

Ein großes Dankeschön möchte ich an Prof. Matthias Mack und Barbara Reich für die Hilfe bei der FACS-Analyse und bei der Zellkultur richten, durch die diese Arbeit sehr dazugewonnen hat.

Vielen Dank für die fachlichen Diskussionen und die Zurverfügungstellung von Materialien, sowie für die Hilfe beim Erlernen der UUO-Methode, an Prof. Dr. Klaus Höcherl.

Ich möchte mich außerdem bei allen Kollegen des Instituts für Physiologie für die tolle Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima am Lehrstuhl bedanken. Insbesondere gilt mein Dank dabei meiner Arbeitsgruppe um Dr. Elisabeth Dobliger, Veronika Kattler, Bernhard Gess, Ina Schießl und Katharina Mederle. Vor allem möchte ich mich bei Veronika für ihre Geduld und die tolle Hilfe im Arbeitsalltag bedanken.

Sehr wichtig war mir die moralische und freundschaftliche Unterstützung von Gerda Treuner, Marcela Loza Hilaes, Dr. Katharina Machura und Dr. Björn Neubauer, für die ich mich ebenfalls herzlich bedanken möchte.

Des Weiteren gilt ein großes Dankeschön meinen Freunden und meiner Familie, allen voran Barbara Czech, die in professioneller Hinsicht immer mit guten Ratschlägen zur Stelle war und mir die beste Freundin ist. Vielen lieben Dank auch an Lea Arnold, die ebenfalls fachlich wie persönlich immer eine große Hilfe war.

Zu guter Letzt möchte ich mich mit ganzem Herzen bei Edwin Schellevis bedanken: Heel erg bedankt voor al je geduld en zorgzaamheid. Jouw support en liefde waren altijd heel belangrijk voor mij.